

Guida al software per l'utente PyroMark[®] Q24 MDx

Versione 1

Destinata all'uso con PyroMark Q24 MDx System (Sistema PyroMark Q24 MDx)

Per uso diagnostico in vitro



9019063



1063400IT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R1

MAT

1063400IT



Tecnologie per campioni e analisi QIAGEN®

QIAGEN è il leader mondiale nelle tecnologie per campioni e analisi destinate all'estrazione e alla purificazione di acidi nucleici a partire da qualsiasi campione biologico. I nostri prodotti e i nostri servizi di alta qualità sono una garanzia di successo, dall'analisi del campione al risultato.

QIAGEN pone nuovi standard:

- nella purificazione del DNA, RNA e delle proteine
- nell'analisi di acidi nucleici e proteine
- nella ricerca sul microRNA e sull'RNAi
- nelle tecnologie automatizzate per campioni e analisi

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per maggiori informazioni, visitate il sito www.qiagen.com.

Sommario

| | |
|--|-----------|
| Simboli | 5 |
| Uso previsto | 5 |
| Limitazioni all'uso del prodotto | 5 |
| Garanzia del prodotto e soddisfazione | 6 |
| Assistenza tecnica | 6 |
| Introduzione | 8 |
| Informazioni sul presente manuale utente | 8 |
| Software PyroMark Q24 MDx | 9 |
| Modalità di analisi | 9 |
| Browser dei collegamenti | 10 |
| Menu principale e barre strumenti | 12 |
| Istogramma | 15 |
| Pyrogram | 16 |
| Selezione dei pozzetti | 18 |
| Avvio del software | 19 |
| Configurazione di un dosaggio AQ o CpG | 19 |
| Flusso di lavoro | 19 |
| Immissione della sequenza da analizzare | 20 |
| Generazione dell'ordine di dispensazione | 23 |
| Aggiunta o rimozione di controlli trattati con bisolfito (Dosaggi CpG) | 25 |
| Impostazione delle posizioni variabili | 25 |
| Modifica dei parametri di analisi | 27 |
| Configurazione di un dosaggio SQA | 33 |
| Flusso di lavoro | 33 |
| Immissione dell'ordine di dispensazione | 34 |
| Modifica dei parametri di analisi | 34 |
| Configurazione di un processo | 36 |
| Flusso di lavoro | 36 |
| Immissione dei parametri di processo | 38 |
| Aggiunta di file di dosaggio alla piastra | 39 |
| Immissione di ID e note sul campione | 39 |

| | |
|--|-----------|
| Copia o eliminazione di contenuti dalle celle | 40 |
| Stampa o esportazione della configurazione piastra come immagine | 41 |
| Definizione di un ID campione e di una nota esternamente | 42 |
| Controllo della configurazione piastra | 43 |
| Esecuzione di un processo sullo Strumento PyroMark Q24 MDx | 44 |
| Flusso di lavoro | 44 |
| Analisi del processo | 45 |
| Flusso di lavoro | 45 |
| Analisi di tutti i pozzetti o dei pozzetti selezionati | 45 |
| Visualizzazione dei risultati di analisi | 46 |
| Modifica dei parametri di analisi | 50 |
| Modifica delle valutazioni di qualità | 52 |
| Sequenze di basi | 53 |
| Visualizzazione, stampa e salvataggio dei report di analisi | 54 |
| Report "Analysis Statistics" | 55 |
| Report "Analysis results" | 56 |
| Report "Pyrogram" | 58 |
| Report "Full" | 60 |
| Report "SNP overview" | 61 |
| Gestione dei metodi dello strumento | 62 |
| Parametri dei metodi | 63 |
| Suggerimenti e consigli generali | 64 |
| Convalida dei dosaggi | 64 |
| Registro analisi | 64 |
| Protezione dei file | 64 |
| Protezione dei risultati di analisi | 65 |
| Guida alla risoluzione dei problemi | 66 |
| Appendice A: Messaggi del Software PyroMark Q24 MDx | 67 |
| Riferimenti bibliografici | 79 |

Simboli



Dispositivo medico per diagnostica in vitro



Marchio CE – Conformemente alla Direttiva Europea per dispositivi medici in vitro (IVD) 98/79/CE



Numero di catalogo



Numero di materiale



Produttore legale



Fare riferimento alle informazioni fornite nel manuale



Nota importante

Uso previsto

PyroMark Q24 MDx Software è il software operativo per PyroMark Q24 MDx per il rilevamento dei cambiamenti in determinate posizioni variabili del DNA che possono avere rilevanza clinica.

PyroMark Q24 MDx è destinato all'uso diagnostico in vitro in Europa.

Limitazioni all'uso del prodotto

Il Software PyroMark Q24 MDx è rivolto ad utenti professionisti, quali tecnici e medici che conoscono le tecniche di biologia molecolare e il funzionamento del sistema PyroMark Q24 MDx.

Tutte le operazioni devono essere effettuate in conformità al presente manuale e come indicato nelle finestre di dialogo visualizzate sullo schermo di PyroMark Q24 MDx, nel rispetto del Manuale utente PyroMark Q24 MDx, in funzione dell'uso secondo i manuali dei Kit QIAGEN indicati per l'uso con PyroMark Q24 MDx, dell'assistenza tecnica di QIAGEN ed entro i limiti imposti dalle specifiche tecniche.

I materiali per la preparazione dei campioni prima delle analisi condotte con la tecnologia Pyrosequencing non sono inclusi nel prodotto.

Il prodotto è destinato ad essere usato unicamente su PyroMark Q24 MDx.

Al fine di ottenere risultati ottimali, occorre attenersi strettamente al manuale utente dello strumento e alla presente guida. La diluizione dei reagenti in maniera diversa da quanto descritto nel presente manuale è sconsigliata e determinerà un calo di prestazioni.

Prestare attenzione alle date di scadenza e alle condizioni di conservazione stampate sulla confezione e sulle etichette di tutti i componenti. Non usare componenti scaduti o conservati in modo errato.

I risultati ricavati dal Sistema PyroMark Q24 MDx devono essere interpretati nel contesto di tutti gli esiti clinici e di laboratorio pertinenti.

Garanzia del prodotto e soddisfazione

QIAGEN garantisce le prestazioni di tutti i prodotti conformemente a quanto descritto nella documentazione relativa. L'acquirente deve stabilire l'adeguatezza del prodotto all'uso previsto. Qualora il prodotto non funzioni in maniera soddisfacente per motivi non associati ad un errato utilizzo, QIAGEN provvederà alla sostituzione gratuita o al rimborso del prezzo di acquisto. Ci riserviamo il diritto di apportare modifiche a qualunque prodotto allo scopo di migliorarne le prestazioni e il design. Qualora un prodotto QIAGEN non soddisfi le proprie esigenze, è possibile contattare il reparto di assistenza tecnica o il distributore locale. Provvederemo ad accreditare l'importo sul vostro conto o a sostituire il prodotto, a seconda della modalità da voi preferita. Condizioni diverse si applicano a strumenti scientifici QIAGEN, servizi e prodotti forniti in ghiaccio secco. Consigliamo di chiedere maggiori informazioni.

Su richiesta è possibile ottenere una copia dei termini e delle condizioni QIAGEN, che sono altresì presenti sul retro delle nostre fatture. In caso di domande sulle specifiche o sulle prestazioni dei prodotti, contattare il reparto di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro della copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Assistenza tecnica

QIAGEN è orgogliosa della qualità e della disponibilità della propria assistenza tecnica. Il nostro reparto di assistenza tecnica è composto da personale qualificato che ha alle spalle una lunga esperienza maturata a livello pratico e teorico nelle tecnologie per campioni e dosaggi e nell'impiego dei prodotti QIAGEN. In caso voleste porgere delle domande o incontriate delle difficoltà con PyroMark Q24 MDx o con i prodotti QIAGEN in generale, vi preghiamo di non esitare a contattarci.

I clienti QIAGEN sono la fonte principale d'informazione relativa all'uso avanzato o specializzato dei nostri prodotti. Tali informazioni sono utili sia agli altri ricercatori che a quelli della QIAGEN. Pertanto vi esortiamo a contattarci,

in caso di suggerimenti da darci sulle prestazioni dei prodotti o su nuove applicazioni e tecniche.

Per l'assistenza tecnica e per ulteriori informazioni, visitate il sito del nostro servizio di assistenza tecnica www.qiagen.com/Support o chiamate uno dei reparti del servizio tecnico di QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Introduzione

Informazioni sul presente manuale utente

Il presente manuale utente descrive funzioni e caratteristiche del Software PyroMark Q24 MDx. Fare riferimento al *Manuale utente PyroMark Q24 MDx* per informazioni complete sulla cura e la manutenzione corrette, oltre che sull'uso dello Strumento PyroMark Q24 MDx e della Stazione di lavoro per il vuoto PyroMark Q24 MDx.

Il presente manuale utente descrive le funzioni del software e degli strumenti associati, e consente all'utente di gestire e modificare file e analisi.

Il presente manuale utente fornisce informazioni sul Software PyroMark Q24 MDx nelle seguenti sezioni:

- Introduzione
- Software PyroMark Q24 MDx
- Avvio del software
- Configurazione di un dosaggio AQ o CpG
- Configurazione di un dosaggio SQA
- Configurazione di un processo
- Esecuzione di un processo sullo Strumento PyroMark Q24 MDx
- Analisi del processo
- Visualizzazione, stampa e salvataggio dei report di analisi
- Gestione dei metodi dello strumento
- Suggerimenti e consigli generali
- Guida alla risoluzione dei problemi

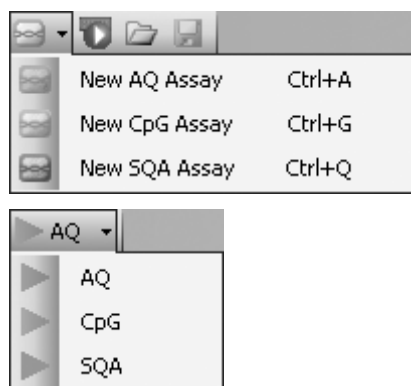
Software PyroMark Q24 MDx

Il Sistema PyroMark Q24 MDx è una soluzione completa, comprendente strumento, stazione di lavoro per il vuoto, chimica e software.

I principali vantaggi del sistema sono:

- Quantificazione ad alta risoluzione di mutazioni di-, tri-, e tetra-alleleliche
- Genotipizzazione e quantificazione di InDel (Inserzioni/Delezioni)
- I dosaggi AQ e CpG usano il contesto della sequenza come controllo di qualità incorporato
- Analisi di metilazione in presenza di SNP
- Controllo di qualità incorporato per trattamento con bisolfito nell'analisi di metilazione
- Confronto tra le sequenze di basi con valutazione della qualità.

Modalità di analisi



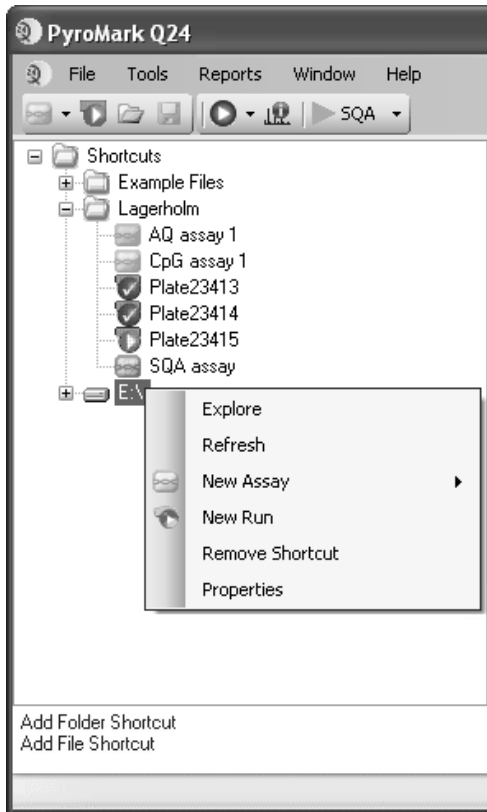
Il Software PyroMark Q24 MDx presenta tre modalità di analisi:

- AQ: Varietà di studi di quantificazione e analisi del genotipo di SNP e InDel (Inserzioni/Delezioni).
- CpG: Analisi di metilazione di più siti CpG consecutivi.
- SQA: Appaiamento di basi di sequenze sconosciute.







I tre diversi tipi di analisi possono essere eseguiti sulla stessa PyroMark Q24 Plate (Piastra PyroMark Q24). Per passare da una modalità all'altra, selezionare "AQ", "CpG" o "SQA" nella barra strumenti.

Browser dei collegamenti

Il browser dei collegamenti costituisce in modo semplice e veloce per accedere ai contenuti delle cartelle, ai dosaggi e ai file di processo utilizzati più di frequente.



Le seguenti icone sono usate per visualizzare le informazioni sui file:

-  File dosaggio AQ
-  File dosaggio CpG
-  File dosaggio SQA
-  Un file di processo che non è stato elaborato
-  Un file di processo che è stato elaborato
-  Collegamento danneggiato. Questo potrebbe essere imputabile a un server di rete temporaneamente inaccessibile o al fatto che il file o la cartella sono stati spostati, rinominati o eliminati all'esterno del software.

Aggiunta e rimozione di collegamenti, aggiornamento dei contenuti di una cartella e visualizzazione delle proprietà del file e della cartella:

- Aggiungere un collegamento a una cartella o a un'unità facendo clic su "Add Folder Shortcut" (Aggiungi collegamento cartella) o facendo clic sul pulsante destro del mouse sulla cartella "Shortcut" (Collegamenti) e selezionando "Add Folder Shortcut" dal menu contestuale.
- Aggiungere un collegamento a una cartella o a un'unità facendo clic su "Add File Shortcut" o facendo clic sul pulsante destro del mouse sulla cartella "Shortcuts" (Collegamenti) e selezionando "Add File Shortcut" dal menu contestuale.
- Rimuovere un collegamento facendo clic col pulsante destro del mouse sul collegamento e selezionare "Remove Shortcut" (Rimuovi collegamento) dal menu contestuale. (I file e le sottocartelle in una cartella di collegamento non possono essere rimossi separatamente).

- Aggiornare i contenuti di una cartella facendovi sopra clic con il pulsante destro del mouse e selezionando "Refresh" (Aggiorna) dal menu contestuale.
- Visualizzare le proprietà del file o della cartella (per esempio i parametri di processo) facendo clic con il pulsante destro del mouse sul file o sulla cartella e selezionando "Properties" (Proprietà) dal menu contestuale.

Nota: Posizionando il puntatore del mouse su un file nel browser dei collegamenti, vengono visualizzati il dosaggio e l'ID dei file di processo (se indicato).

Creazione, apertura e copia di file, e visualizzazione del registro di processo di un'elaborazione:

- Creare un nuovo file di dosaggio facendo clic con il pulsante destro del mouse sulla cartella desiderata e selezionando "New Assay" (Nuovo dosaggio) e il tipo di dosaggio desiderato dal menu contestuale. Immettere il nome del file e premere "Enter" (Invio). Per configurare il dosaggio, vedere a pagina 19 (AQ o CpG) o a pagina 33 (SQA).
- Creare un nuovo file di processo facendo clic con il pulsante destro del mouse sulla cartella desiderata e selezionando "New Run" (Nuovo processo) dal menu contestuale. Immettere il nome del file e premere "Enter". Per configurare il processo, vedere a pagina 36.

Copiare un file elaborato e ripeterne l'esecuzione facendo clic con il pulsante destro del mouse sul file di processo e selezionando "Copy and Rerun" (Copia e ripeti elaborazione) dal menu contestuale.

Nota: Verrà copiata solo la configurazione del processo, non il processo e i dati di analisi.

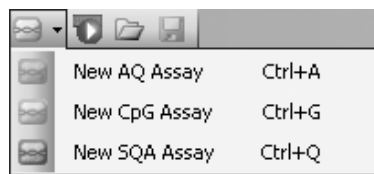
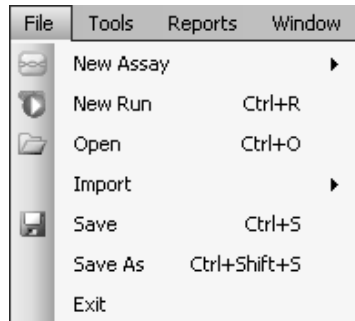
- Copiare un file facendo clic con il pulsante destro del mouse sulla cartella contenente il file e selezionare "Explore" (Esplora) dal menu contestuale. Si apre Windows® Explorer. Per ulteriori informazioni, premere il tasto "F1" per aprire la guida in linea di Windows Explorer.


Nota: per non rischiare di perdere dati, non copiare un file aperto nel Software PyroMark Q24 MDx.


- Aprire un file facendovi sopra doppio clic o facendo clic con il pulsante destro del mouse e selezionando "Open" (Apri) dal menu contestuale. Per aprire un file di processo elaborato, selezionare "Open with" (Apri con) seguito dalla modalità di analisi ("AQ", "CpG", o "SQA").
- Visualizzare i parametri di processo e un registro di processo del file elaborato facendo clic con il pulsante destro del mouse e selezionando "Run Information" (Informazioni di processo) dal menu contestuale.


Menu principale e barre strumenti

Menu File e barre strumenti




Selezionare "New Assay" o fare clic  nella barra strumenti e selezionare il tipo di dosaggio desiderato per creare un nuovo file di analisi. Per configurare il dosaggio, vedere a pagina 19 (AQ o CpG) o a pagina 33 (dosaggio SQA).

Selezionare "New Run" o fare clic sul pulsante verde  nella barra strumenti per creare un nuovo file di processo. Per configurare il processo, vedere a pagina 36.

Selezionare "Open" o fare clic  nella barra strumenti per aprire un dosaggio o un file di processo salvato.

Selezionare "Create New Run from Sample Layout File" (Crea nuovo processo da file layout campione) dal sottomenu "Import" (Importa) per creare un nuovo processo usando un layout di piastra per ID campione e note (opzionali) definiti in un file di testo delimitato da tabulazioni o virgole (*.tsv, *.txt, o *.csv); vedere a pagina 42.

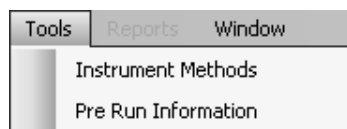
Selezionare "Create New AQ/CpG Assay from Assay Design File" (Crea nuovo dosaggio AQ/CpG da file di disegno dosaggio) dal menu "Import" per creare un nuovo dosaggio AQ o CpG su un file di dosaggio (*.xml) creato con il Software PyroMark Assay Design. Il software importerà la sequenza da analizzare e i nomi delle posizioni variabili.

Selezionare "Save" (Salva) o fare clic  nella barra strumenti per salvare le modifiche nel file corrente. Se il file non è mai stato salvato, selezionare la posizione e immettere il nome file nella finestra di dialogo che si apre.


Selezionare "Save As" (Salva con nome) per salvare una copia del file corrente. Selezionare la posizione e immettere il nome file nella finestra di dialogo che si apre.

Selezionare "Exit" (Esci) per chiudere il software.

Menu strumenti per i file di processo non elaborati

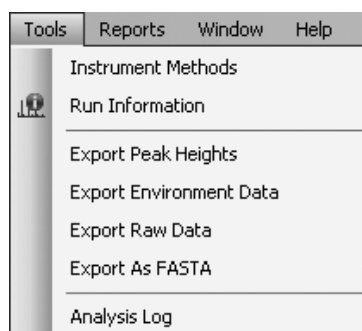



Selezionare "Instrument Methods" (Metodi strumento) per visualizzare le impostazioni per i metodi strumento e, se necessario, importare o impostare nuovi metodi in base alle impostazioni fornite da QIAGEN (vedere Gestione dei metodi dello strumento, pagina 62).

Selezionare "Pre Run Information" (Informazioni pre-elaborazione) per visualizzare la configurazione della piastra e un elenco dei volumi richiesti della miscela enzimatica, di substrato e i nucleotidi per il file di processo corrente. Per stampare il report, fare clic su .

Nota: Per stampare il report "Pre Run Information" a colori, attivare l'opzione "Print background colors and images" (Stampa immagini e colori di sfondo) in Internet Explorer ("Tools/Internet Options/Advanced/Printing") (Strumenti/Opzioni Internet/Avanzate/Stampa).

Menu strumenti per file di processo elaborati



Selezionare "Run Information" per visualizzare i parametri di processo e un registro di processo del file corrente. Per stampare il report, fare clic su .

Selezionare "Export Peak Heights" (Esporta altezze picchi) per salvare le altezze dei picchi di tutti i pozzetti usati come file di testo.

Selezionare "Export Environment Data" (Esporta dati ambiente) per salvare la velocità del mixer, la temperatura di blocco e i valori di pressione come file di testo. È inoltre indicata la temperatura ambiente, la temperatura del coperchio della camera di processo e del refrigerante.

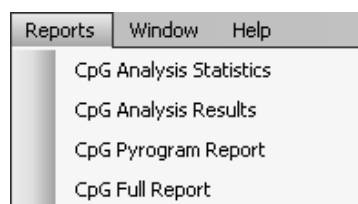
Selezionare "Export Raw Data" (Esporta dati grezzi) per salvare i dati relativi a intensità e dispensazione come file di testo.

Selezionare "Export As FASTA" (Esporta come FASTA) per salvare le sequenze di basi in formato FASTA (solo dosaggi SQA). Nella finestra di dialogo che si apre, selezionare i pozzetti da includere (tutti o alcuni), l'ordinamento dei pozzetti (riga o colonna), e le basi nelle sequenze da includere (tutti, valutazione di qualità superata, valutazione di qualità superata + controllare, o solo finestra di controllo qualità).

Selezionare “Analysis Log” (Registro analisi) per visualizzare o salvare il registro con tutte le analisi eseguite sul pozzetto selezionato come file HTML. Per ogni analisi vengono registrate relative impostazioni, modalità di analisi (AQ, CpG, o SQA), versione di analisi, risultati (incluse le avvertenze), data e ora e l’account utente Windows utilizzato per eseguire l’analisi (vedere Suggerimenti e consigli generali, pagina 64).

I file di testo (*.tsv o *.csv) possono essere importati in Microsoft® Excel® o altre applicazioni in grado di gestire dati separati da punto e virgola (;) o tabulazioni. Questo è utile quando occorre eseguire calcoli supplementari sui dati.

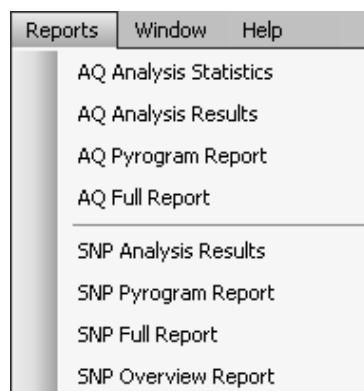
Menu Report per processi CpG



Il report “Analysis Statistics” (Statistiche analisi) include le statistiche dell’analisi per tutti i pozzetti o per quelli selezionati.

Il report “Analysis Results” (Risultati analisi) include le informazioni sui pozzetti e i risultati di analisi per tutti i pozzetti o per quelli selezionati.

Menu Report per processi AQ

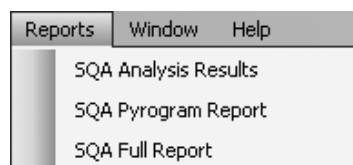


“Pyrogram report” (Report Pyrogram) include le informazioni sui pozzetti e il Pyrogram® per tutti i pozzetti o per quelli selezionati.

“Full Report” (Report completo) include i parametri di processo, il registro di processo, le informazioni dei pozzetti e i risultati di analisi (incluso Pyrogram) per tutti i pozzetti o per quelli selezionati.

“SNP Overview Report” (Report panoramica SNP) include i genotipi e le valutazioni di qualità di tutti gli SNP e InDel (Inserzioni/Delezioni). Le informazioni sono presentate nelle panoramiche della piastra con un numero per ogni posizione della piastra.

Menu Report per processi SQA

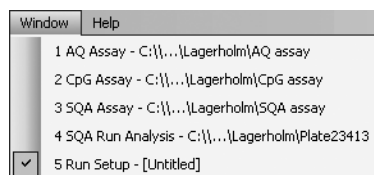


Le opzioni dei report sono disponibili solo per i processi elaborati. Per ulteriori informazioni sui report, vedere a pagina 54.

Nota: per visualizzare i report generati in formato PDF, sul computer deve essere installato un programma di lettura PDF. Adobe® Reader® può essere scaricato all’indirizzo www.adobe.com.

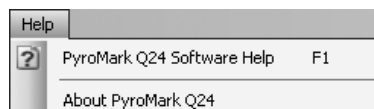
Menu Window (Finestra)

Il menu "Window" (Finestra) consente di passare da un file aperto all'altro all'interno del software.



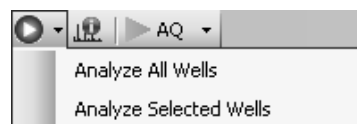
Menu Help (Guida)

Selezionare "PyroMark Q24 Software Help" (Guida al software per l'utente PyroMark Q24) o premere il tasto F1 per aprire questa guida utente.



Barra strumenti analisi

Fare clic su e selezionare "Analyze All Wells" (Analizza tutti i pozzetti) o "Analyze Selected Wells" (Analizza i pozzetti selezionati, pagina 18) per il file di processo corrente.

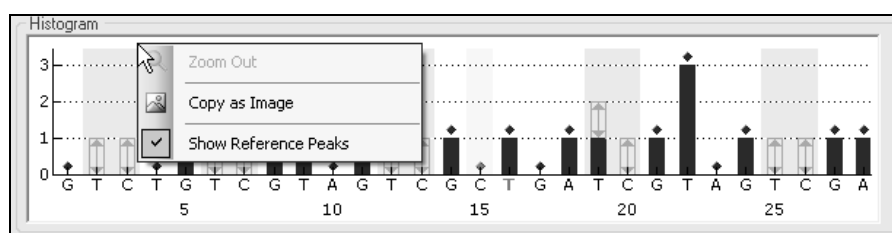


Fare clic su per visualizzare i parametri di processo e un registro di processo per il file corrente. Per stampare il report, fare clic su .



Selezionare "AQ", "CpG", o "SQA" nella barra strumenti per passare da una modalità di analisi all'altra.

Istogramma



Istogramma raffigurante il risultato di un dosaggio CpG teorico.

Quando si configura un dosaggio AQ o CpG, nell'area "Histogram" (Istogramma) viene visualizzata la rappresentazione teorica dell'avvicendamento previsto dei picchi di Pyrosequencing®. Nell'istogramma vengono usati i seguenti colori e icone:

- Le posizioni variabili sono evidenziate da un colore grigio azzurro di fondo
- I picchi di riferimento sono distinguibili dalla presenza di rombi blu sopra la loro sommità

- I controlli trattati con bisolfito sono evidenziati da un colore giallo di fondo. I picchi di riferimento nei controlli trattati con bisolfito sono contrassegnati da rombi arancioni (solo dosaggi CpG).

Ingrandimento dell'istogramma

È possibile ingrandire l'istogramma selezionandone una sezione con il pulsante sinistro del mouse.

Per ridurre l'immagine, fare clic con il pulsante destro del mouse sull'area dell'istogramma e selezionare "Zoom Out" (Riduci) dal menu contestuale (lo zoom viene impostato al livello precedente) o facendo doppio clic sull'area dell'istogramma (lo zoom è impostato al 100%).

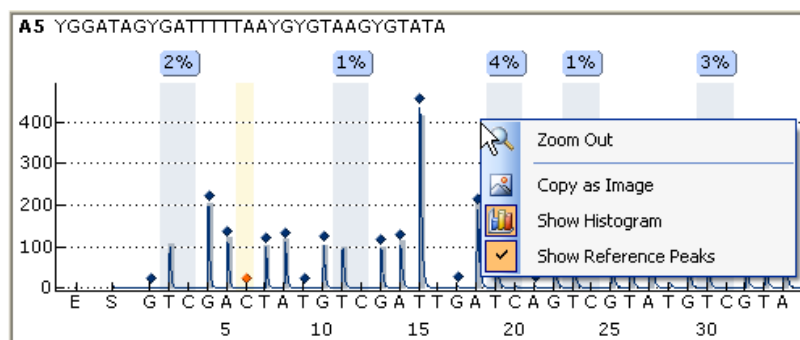
Esportazione dell'istogramma come immagine

L'istogramma può essere copiato come immagine sugli appunti facendo clic con il pulsante destro del mouse sull'istogramma e selezionando "Copia come immagine" dal menu contestuale. L'immagine può essere incollata nelle applicazioni che supportano immagini Enhanced metafile (EMF).

Pyrogram

Pyrogram è il grafico risultante da una reazione di sequenziamento eseguita utilizzando la tecnologia Pyrosequencing. I nucleotidi incorporati sono visualizzati come picchi in Pyrogram.

Dosaggi AQ e CpG



Le seguenti informazioni, icone e colori sono visualizzati e usati nell'area Pyrogram per un dosaggio AQ o CpG:

- Il nome del pozzetto e la sequenza da analizzare sono visualizzati nell'angolo superiore sinistro.
- Il risultato di analisi (frequenze alleliche o percentuale di metilazione) è visualizzato sopra ogni posizione variabile, per esempio $\frac{56\%}{44\%}$ (InDel, Inserzione/Delezione) e $\frac{96\%}{4\%}$. Il colore di fondo è indicativo della qualità del risultato di analisi; vedere legenda colori a pagina 48. Se una valutazione

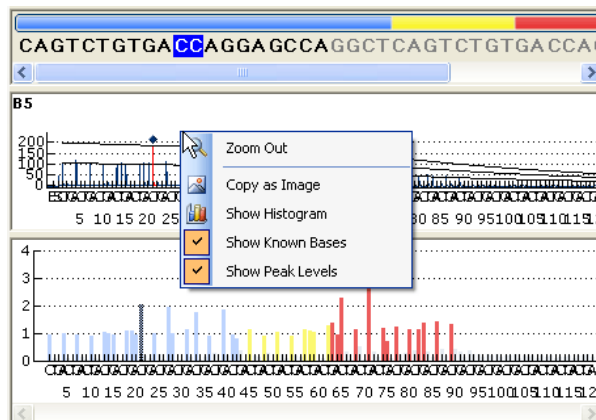
qualità è stata modificata dall'utente, questa modifica è indicata da un contorno attorno al risultato di analisi, per esempio **44%**. Posizionando il puntatore del mouse sul risultato di analisi, vengono visualizzati il numero della posizione e le avvertenze sull'analisi.

Nota: ☐ (in bianco) = Deselezionato dall'utente. **N/A** (in bianco) = Il software non supporta l'analisi, per esempio l'analisi di SNP in modalità CpG. **N/A** (in rosso) = Impossibile analizzare a causa di dati insufficienti.

- Le posizioni variabili sono evidenziate da un colore grigio azzurro di fondo.
- I picchi di riferimento sono distinguibili dalla presenza di rombi blu sopra la loro sommità.
- I controlli trattati con bisolfito sono evidenziati da un colore giallo chiaro di fondo. I picchi di riferimento sono distinguibili dalla presenza di rombi arancioni sopra la loro sommità (solo dosaggi CpG).
- Per visualizzare l'altezza di un picco, posizionare il puntatore del mouse sulla sommità del picco. Una descrizione comando visualizza l'altezza.
- L'istogramma viene visualizzato in grigio sopra i picchi. Ingrandirlo per migliorarne la visualizzazione.

Nota: facendo clic con il pulsante destro del mouse nell'area Pyrogram, è possibile nascondere/visualizzare l'istogramma e i picchi di riferimento.

Dosaggi SQA



Quando si seleziona una base nella sequenza di basi, il picco corrispondente viene evidenziato in entrambe le aree di Pyrogram e vice versa.

Le informazioni e i colori seguenti sono visualizzati e usati nell'area Pyrogram per un dosaggio AQ o CpG:

- Il nome del pozzetto è visualizzato nell'angolo superiore sinistro.
- Per visualizzare l'altezza di un picco, posizionare il puntatore del mouse sulla sommità del picco. Una descrizione comando visualizza l'altezza.

- Durante la visualizzazione dell'istogramma, compare un pirogramma compensato in grigio sopra i picchi nell'area Pyrogram. Ingrandirlo per migliorarne la visualizzazione.
- Durante la visualizzazione di basi note, i picchi con basi note sono contrassegnati da rombi blu in Pyrogram.
- Durante la visualizzazione dei livelli dei picchi, Pyrogram visualizza i livelli dei picchi calcolati.
- Nel pirogramma compensato nell'area inferiore, i picchi sono colorati in base alle loro valutazioni di qualità (vedere legenda colori, pagina 48).

Nota: facendo clic con il pulsante destro del mouse sull'area Pyrogram, è possibile nascondere/visualizzare istogramma, basi note e livelli dei picchi.

Ingrandimento del pirogramma

È possibile ingrandire il pirogramma selezionandone una sezione con il pulsante sinistro del mouse.

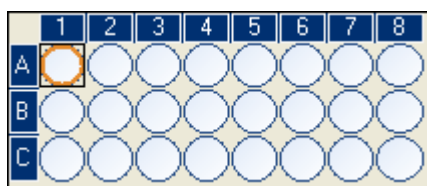
Per ridurre l'immagine, fare clic con il pulsante destro del mouse sull'area Pyrogram e selezionare "Zoom Out" dal menu contestuale (lo zoom viene impostato al livello precedente) o fare doppio clic sull'area Pyrogram (lo zoom è impostato al 100%).

Esportazione del pirogramma come immagine

Il pirogramma può essere copiato come immagine negli appunti facendo clic con il pulsante destro del mouse nell'area Pyrogram e selezionando "Copia come immagine" dal menu contestuale. L'immagine può essere incollata nelle applicazioni che supportano immagini Enhanced Metafile (EMF).

Selezione dei pozzetti

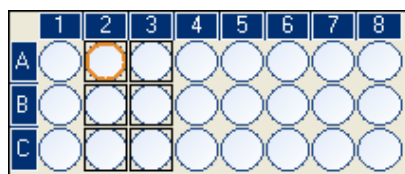
Per selezionare un singolo pozzetto, è sufficiente farvi clic sopra.



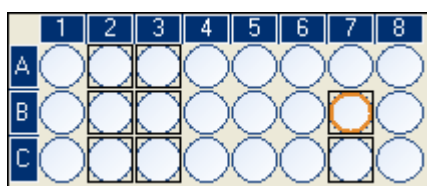
Per selezionare un gruppo rettangolare di pozzetti, per esempio A2-A3, B2-B3 e C2-C3:

- Premere e tenere premuto il pulsante sinistro del mouse trascinando al contempo il puntatore dal pozzetto A2 a C3, oppure
- Selezionare il pozzetto A2 e premere e tenere premuto il tasto "Shift" selezionando al contempo il pozzetto C3, oppure

- Selezionare il pozzetto A2 e tenere premuto il tasto "Shift" premendo al contempo il tasto "Freccia destra" una volta e il tasto "Freccia giù" due volte.



Per aggiungere pozzetti alla suddetta selezione, per esempio i pozzetti B7 e C7, tenere premuto il tasto "Ctrl" e selezionare al contempo i pozzetti.



Per deselegionare un pozzetto, tenere premuto il tasto "Ctrl" e selezionare al contempo il pozzetto.

Nota: se nella piastra sono selezionati più pozzetti, le informazioni relative al pozzetto nel riquadro di selezione arancione (nella vista analisi) vengono visualizzate nell'area "Informazioni pozzetto" area, ecc.

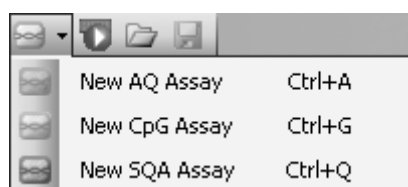
Avvio del software

Nel menu "Start" di Windows, selezionare "(All) Programs/PyroMark/PyroMark Q24" (Tutti i programmi/PyroMark/PyroMark Q24).

È possibile accedere alla *Guida al software per l'utente PyroMark Q24 MDx* in qualsiasi momento premendo il tasto "F1" quando si è all'interno del software.

Configurazione di un dosaggio AQ o CpG

Flusso di lavoro




1. Fare clic su  nella barra strumenti e selezionare "New AQ Assay" (Nuovo dosaggio AQ) o "New CpG Assay" (Nuovo dosaggio CpG). Viene creato un nuovo file di dosaggio.
2. Immettere la sequenza da analizzare (vedere a pagina 20).

3. Fare clic sul pulsante **“Generate Dispensation Order”** (Genera ordine di dispensazione) (vedere a pagina 23).
4. **Opzionale:** per creare un dosaggio CpG, immettere **“Sequence Before Bisulfite Treatment”** (Sequenza prima del trattamento con bisolfito). Questa informazione è utile quando si aggiungono controlli trattati con bisolfito.
5. **Raccomandazione:** per la creazione di un dosaggio CpG, aggiungere i controlli trattati con bisolfito, preferibilmente all’inizio della sequenza (vedere pagina 25).
6. **Opzionale:** immettere informazioni sul dosaggio nella casella di testo **“Assay Note”** (Nota dosaggio).
7. **Opzionale:** impostazione delle posizioni variabili (vedere pagina 25).
8. **Prima di elaborare i campioni, convalidare il dosaggio utilizzando un campione di DNA di riferimento, (vedere Appendice B del Manuale utente PyroMark Q24 MDx).**
9. **Opzionale:** se applicabile, durante la convalida del dosaggio, modificare i parametri di analisi, vedere a pagina 27).
10. **Opzionale:** bloccare il dosaggio per renderlo non editabile facendo clic sul pulsante **“Blocca dosaggio”** nella parte inferiore della schermata di configurazione dosaggi. Un dosaggio bloccato (🔒) elaborato sullo Strumento PyroMark Q24 MDx non può essere sbloccato (vale a dire che non sarà possibile modificare i parametri o i risultati di analisi dopo l’elaborazione del dosaggio).

Nota: nel browser dei collegamenti, è possibile creare un nuovo file del dosaggio facendo clic con il pulsante destro del mouse nella cartella in cui si intende posizionarlo e selezionando **“New Assay”** seguito da **“AQ Assay”** (Dosaggio AQ) o **“CpG Assay”** (Dosaggio CpG) dal menu contestuale. Immettere il nome del file e premere **“Enter”**. Per aggiungere un collegamento a una cartella o a un’unità, fare clic su **“Add Folder Shortcut”**.

Nota: posizionando il puntatore del mouse sul file del dosaggio, viene visualizzata una nota sul dosaggio nel browser dei collegamenti.

Nota: per salvare il file, fare clic su  nella barra strumenti. Se il file non è mai stato salvato, selezionare la posizione e immettere il nome file nella finestra di dialogo che si apre.

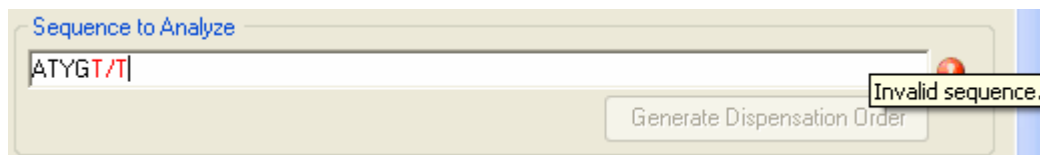
Immissione della sequenza da analizzare

Digitare o incollare (**“Ctrl+V”**) la sequenza da analizzare nella casella di testo **“Sequence to Analyze”** (Sequenza da analizzare). Per creare un dosaggio CpG, immettere la sequenza dopo il trattamento con bisolfito.

Quando si immette la sequenza di DNA nel software, sono applicabili le seguenti regole:

- I caratteri ammessi per l'immissione della sequenza sono A, C, G, e T oltre ai codici IUPAC.
- Le posizioni variabili possono essere immesse usando codici IUPAC o una barra (/) come separatore tra due potenziali basi (per esempio, C/T).
- Le InDel (Inserzioni/Delezioni) devono essere immesse inserendole tra parentesi quadre "[]" (per esempio [AT]).
- La sequenza non deve includere oltre 400 caratteri o 100 posizioni variabili.
- Le posizioni variabili che implicano una combinazione di SNP e inserzioni/delezioni devono essere immesse utilizzando una combinazione di "/" o codici IUPAC e "[]". Per esempio, [T/A] o [W] rappresenta un polimorfismo triallelico dove i possibili alleli sono una T, una A, o nessuna delle due (delezione).
- Non è possibile avere una combinazione di un SNP e di basi costanti con una InDel (inserzione/delezione) (per esempio, [A/TC]).
- Le inserzioni/delezioni annidate non sono supportate (per esempio, [ATT[C]G]).

Se la sequenza da analizzare contiene un errore, questo viene segnalato da un punto esclamativo rosso al termine della casella di testo. Posizionare il puntatore del mouse sul punto esclamativo per visualizzare una spiegazione dell'errore. Il carattere (o più di uno) che ha causato l'errore sarà contrassegnato in rosso nella sequenza da analizzare.



Poiché T/T non è una posizione variabile valida, causa un errore "Invalid sequence" (Sequenza non valida).

Nota: Nell'analisi di pattern di metilazione "non standard", per esempio metilazioni di C che non sono seguite da G, questi pattern possono essere analizzati in modalità AQ. Per l'analisi in modalità CpG, immettere G supplementari nella casella di testo "Sequence to Analyze" e impostare le altezze previste delle G supplementari rispetto a zero (0); vedere Regolazione delle altezze delle barre dell'istogramma, pagina 32.

Codici IUPAC

| Codice | Descrizione | Codice | Descrizione |
|--------|--------------------|--------|-------------------------------|
| A | Adenina | W | T o A |
| C | Citosina | S | C o G |
| G | Guanina | B | C, T, o G (non A) |
| T | Timina | D | A, T, o G (non C) |
| R | Purina (A o G) | H | A, T, o C (non G) |
| Y | Pirimidina (C o T) | V | A, C, o G (non T) |
| M | C o A | N | Qualsiasi base (A, C, G, o T) |
| K | T o G | | |

Nota: S, B, V e N non sono valide dopo trattamento con bisolfito.

Pattern validi in un dosaggio CpG

I pattern non supportati dopo il trattamento con bisolfito non sono validi in un dosaggio CpG. Per esempio, CG/TGAC/G non è valido poiché C/TG è un sito CpG più avanti e C/G non può esistere dopo il trattamento con bisolfito.

Il sito CpG e gli SNP successivi possono essere inclusi in un test "forward":

- Sito CpG: C/TG
- SNP: A/T, A/G, G/T, e A/T/G (vale a dire che C non può essere inclusa).

Il sito CpG e gli SNP successivi possono essere inclusi in un test "reverse" (inverso):

- Sito CpG: CG/A
- SNP: A/T, A/C, C/T e A/T/C (vale a dire G non può essere inclusa).

Nota: il software non supporta l'analisi di siti CpG che includono una posizione variabile supplementare, per esempio A/C/TG. Questi tipi di SNP possono essere analizzati digitando C/TG nella casella di testo "Sequence to Analyze" (Sequenza da analizzare) e ATCG nella casella di testo "Dispensation Order" (Ordine di dispensazione). Procedere con il processo come di consueto. Dopo l'analisi dei siti CpG, passare in modalità AQ e cambiare C/TG in A/C/TG (nella casella di testo "Sequence to Analyze") e analizzare la posizione variabile. Analogamente, C/TG/A possono essere analizzate digitando C/TG

nella casella di testo "Sequence to Analyze" e TCGA nella casella di testo "Dispensation Order". Dopo aver analizzato i siti CpG, passare in modalità AQ e cambiare C/TG in C/TG/A (nella casella di testo "Sequence to Analyze") e analizzare la posizione variabile.

Generazione dell'ordine di dispensazione

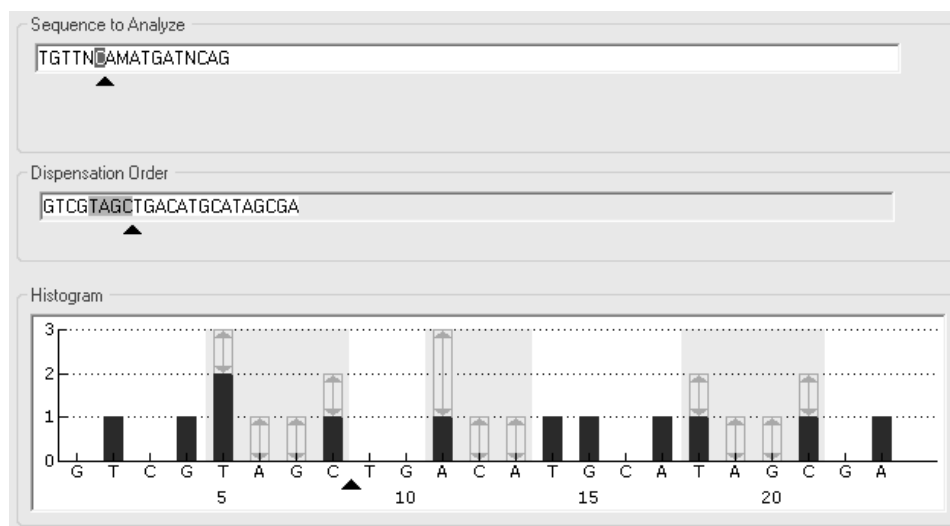
Il software genera un ordine di dispensazione per la sequenza immessa facendo clic sul pulsante "Generate Dispensation Order". L'ordine di dispensazione generato include dispensazioni in bianco per garantire di ottenere la sequenza corretta.

Quando si creano dosaggi CpG, l'ordine di dispensazione deve includere anche controlli trattati con bisolfito. Questi controlli devono essere aggiunti manualmente dall'utente, una volta generato l'ordine di dispensazione (vedere pagina 25).

Se necessario, l'ordine di dispensazione può essere immesso o modificato manualmente.

Nota: facendo clic su "Generate Dispensation Order", qualsiasi ordine di dispensazione esistente verrà sovrascritto.

Nota: quando si seleziona la posizione di una base nella sequenza da analizzare, la dispensazione corrispondente viene evidenziata con un colore di fondo grigio e vice versa.




La freccia nella sequenza da analizzare, l'ordine di dispensazione e l'istogramma mostrano la posizione del cursore.

Nota: se l'ultima posizione variabile nella sequenza da analizzare è una lunga InDel (Inserzione/Delezione), la dispensazione sarà eseguita solo fino al rilevamento di tre picchi variabili e fino a soddisfare il requisito di cinque picchi di riferimento. Per dispensare l'intera Inserzione/Delezione, aggiungere una

posizione variabile dopo InDel o modificare manualmente l'ordine di dispensazione.

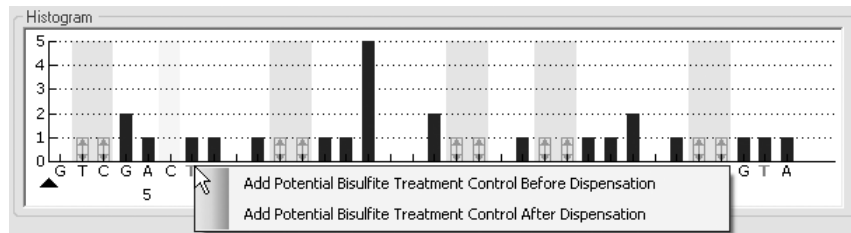
Nota: se non è possibile raggiungere con la sequenza la fase 32 prima della dispensazione degli alleli, l'ordine di dispensazione non sarà completato. Per esempio, la sequenza ACTCDDDDG avrà l'ordine di dispensazione ACTC, in quanto i quattro polimorfismi D genereranno un tratto fuori fase su un numero eccessivo di alleli.

Avvertenze per la dispensazione

Se l'ordine di dispensazione contiene un'avvertenza, questa è contrassegnata da un punto esclamativo rosso  alla fine della casella di testo "Dispensation Order". È possibile elaborare un dosaggio caratterizzato da un'avvertenza di dispensazione, ma questa avvertenza deve essere tenuta in considerazione al momento della valutazione dei risultati di analisi. Posizionando il puntatore del mouse sul punto esclamativo, verrà visualizzata la spiegazione dell'avvertenza.

| Avvertenza | Azione suggerita |
|--|---|
| "Sequence uncertain due to lack of terminal sequence information" (Sequenza incerta per informazioni sequenza terminale insufficienti). | Il problema può essere risolto immettendo maggiori informazioni sulla sequenza o riducendo il numero di dispensazioni. |
| "Sequence not in phase at the end of the dispensations" (Sequenza non in fase al termine delle dispensazioni). | Il problema può essere risolto regolando l'ordine di dispensazione (manualmente o facendo clic su "Generate Dispensation Order" - Genera ordine di dispensazione) o immettendo maggiori informazioni sulla sequenza. Nota: se il problema persiste, il tratto fuori fase sarà escluso dell'analisi. |
| "The generated dispensation order contains less reference peaks than required" (L'ordine di dispensazione generato contiene meno picchi di riferimento del necessario). | Se possibile, immettere ulteriori informazioni sulla sequenza e aumentare il numero di dispensazioni. Al fine di ottenere la valutazione di qualità dei risultati ottimale, si raccomanda di disporre di almeno cinque picchi di riferimento con altezza 1, 2 o 3. |

Aggiunta o rimozione di controlli trattati con bisolfito (Dosaggi CpG)



I dosaggi CpG devono contenere almeno un controllo interno per stabilire che il trattamento con bisolfito sia riuscito, preferibilmente all'inizio della sequenza. Le analisi di Pyrosequencing possono contenere un controllo interno per stabilire che il trattamento con bisolfito sia riuscito. Le basi C che non sono seguite da G nella sequenza, normalmente non sono metilate, e dovrebbero pertanto essere pienamente convertite in T in seguito a trattamento con bisolfito e PCR. In seguito a un trattamento con bisolfito eseguito con successo, tutti gli stampi dovrebbero mostrare solo T e nessun C in queste posizioni. Per i test inversi, tutti gli stampi dovrebbero mostrare solo A e nessun G in queste posizioni.

Le posizioni potenziali dei controlli trattati con bisolfito sono contrassegnate da una lettera arancione in grassetto nell'istogramma: **T** in un test "forward" e **A** in un test "reverse".

È possibile aggiungere un controllo trattato con bisolfito facendo clic con il pulsante sinistro del mouse sulla lettera in grassetto **T** o **A** e selezionando l'opzione desiderata dal menu contestuale. Può inoltre essere aggiunto manualmente aggiungendo una C prima o dopo una T nell'ordine di dispensazione.

È possibile rimuovere un controllo trattato con bisolfito facendo clic con il pulsante sinistro del mouse sul controllo (C in un test "forward" o G in un test "reverse") e selezionando "Remove Bisulfite Control" (Rimuovi controllo con bisolfito) dal menu contestuale.

Nota: nella sequenza precedente al trattamento con bisolfito, verificare se i controlli trattati con bisolfito suggeriti sono stati convertiti da C a T (vale a dire G e A in un test inverso) e se sono idonei come controlli, oppure no.

Impostazione delle posizioni variabili

Le posizioni variabili possono essere impostate nella scheda "Variable Positions" (Posizioni variabili). I parametri disponibili sono elencati di seguito.

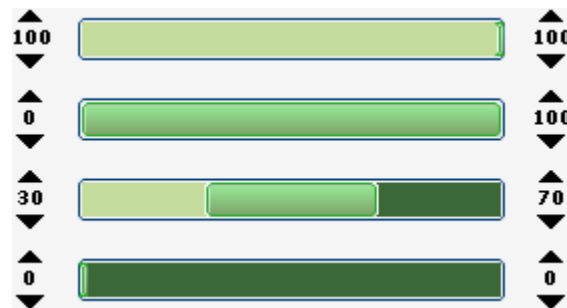
Nota: se la sequenza da analizzare è cambiata (ed è stato generato un nuovo ordine di dispensazione), i parametri delle posizioni variabili vengono ripristinati ai valori predefiniti.

| | |
|---|---|
| "Position" (Posizione) | L'ubicazione della posizione variabile nella sequenza da analizzare, calcolata da sinistra a destra. |
| "Name" (Nome) | Nome della posizione variabile. Per cambiare il nome, selezionare la casella di testo (i contenuti correnti verranno selezionati) o fare doppio clic sulla casella di testo. |
| "Type" (Tipo) | Tipo della posizione variabile; sito SNP, InDel o CpG. |
| "Analyze" (Analizza) | Se questa opzione è selezionata, la posizione variabile verrà analizzata. Nota: questa opzione non è disponibile per posizioni variabili che non possono essere analizzati per il tipo di dosaggio corrente. |
| Range di metilazione (solo dosaggi CpG) | <p>La metilazione CpG prevista. Impostando questo parametro per tutti i siti CpG, si identificano facilmente i siti (nei risultati di analisi) che non rientrano nel range di metilazione previsto:</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ L'area di colore verde chiaro è al di sotto del range previsto. ■ L'area di colore verde rientra nel range previsto. ■ L'area di colore verde scuro è al di sopra del range previsto. <p>Nota: la metilazione prevista non può essere impostata per siti CpG con l'opzione "Analyze" (Analizza) deselezionata.</p> <p>L'area del range previsto può essere spostata verso sinistra o verso destra tenendo premuto il pulsante sinistro del mouse e spostando al contempo l'area con il mouse.</p> <p>Le frecce possono essere spostate per aumentare o diminuire il range previsto. È inoltre possibile aumentare o diminuire il range previsto nel seguente modo:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Posizionando il puntatore del mouse sull'estremità sinistra o destra dell'area di colore verde, in modo tale che il puntatore si modifichi da freccia bianca a ➤ |

2. Spostando il mouse verso sinistra o verso destra tenendo al contempo premuto il pulsante sinistro del mouse.

Per modificare tutti i range di metilazione contemporaneamente, tenere premuto il tasto "Shift" e modificare al contempo uno dei range.

Esempi di range di metilazione



1. Metilazione prevista= 100%.
2. Metilazione prevista= 0–100%.
3. Metilazione prevista= 30–70% (valore predefinito)
4. Metilazione prevista= 0%

Per ripristinare i parametri nelle schede "Variable Positions" e "Analysis Parameters" (Parametri di analisi) ai loro valori predefiniti, fare clic su "Revert to Default" (Ripristina a predefiniti).

Modifica dei parametri di analisi

Le impostazioni di analisi predefinite sono state configurate per fornire risultati di analisi ottimali per la maggior parte dei dosaggi. Se applicabile, durante la convalida del dosaggio, i risultati possono essere ottimizzati modificando i parametri di analisi attraverso i seguenti metodi:

- Modifica dei parametri di analisi nella scheda "Analysis Parameters"; vedere sotto.
- Abilitazione o disabilitazione dei picchi di riferimento e dei controlli trattati con bisolfito (solo dosaggi CpG); vedere a pagina 31.
- Regolazione delle altezze delle barre dell'istogramma, vedere a pagina 32.
- Per abilitare o disabilitare le posizioni variabili e/o modificare i range di metilazione previsti (solo dosaggi CpG), vedere Configurazione delle posizioni variabili, pagina 25.

Verificare che le modifiche vengano convalidate; vedere Appendice B di *Manuale utente PyroMark Q24 MDx*.

Nota: quando si usano kit QIAGEN, adottare le impostazioni riportate nei manuali dei rispettivi kit.

Nota: tutte le modifiche salvate vengono inserite nel registro. Per visualizzare il registro delle modifiche di un dosaggio, aprire il file del dosaggio e fare clic su "Show Change Log" (Mostra registro modifiche).

Modifica dei parametri di analisi nella scheda "Analysis Parameters"

Nella scheda "Analysis Parameters", è possibile modificare i seguenti parametri di analisi.

"Unsuccessful bisulfite treatment" (Trattamento con bisolfito non riuscito, solo dosaggi CpG)

Questi parametri indicano le percentuali più elevate accettabili della sequenza non convertita al fine di ottenere la valutazione di qualità "Passed" (Superata) e "Check" (Controllare) per i siti CpG. I valori immessi sono confrontati al valore dell'altezza del singolo picco determinato dall'algoritmo di analisi.

"Allowed percentage for passed quality" (Percentuale ammessa per ottenere la valutazione di qualità "Superata")

Percentuali più elevate accettabili di sequenza non convertita al fine di ottenere la valutazione di qualità "Passed" per i siti CpG.

Il valore predefinito è 5%.

Nota: il valore non può essere superiore alla percentuale ammessa per ottenere la valutazione di qualità "check" (vedere sotto).

“Allowed percentage for check quality”
(Percentuale ammessa per ottenere la valutazione di qualità “Controllare”)

Percentuali più elevate accettabili di sequenza non convertita al fine di ottenere la valutazione di qualità “Check” per i siti CpG. Durante l’analisi, compare l’avvertenza “Uncertain bisulfite conversion at dispensation: number(s)” (Conversione con bisolfito incerta alla dispensazione: numero(i))

Nota: questa regola è applicata solo se non viene soddisfatto il criterio per la valutazione di qualità “Passed”.

Una percentuale più elevata accettabile di sequenza non convertita rispetto al valore impostato determinerà una valutazione di qualità “Failed” (Non superata) per tutti i siti CpG. Durante l’analisi compare l’avvertenza “Failed bisulfite conversion at dispensation: number(s)” (Conversione con bisolfito non riuscita alla dispensazione: numero(i))

Il valore predefinito è 7%.

Nota: Il valore non può essere inferiore al valore “Required peak height for passed quality” (Altezza di picco richiesta per ottenere la valutazione di qualità “Superata”, vedere sopra).

“Peak height threshold” (Soglia altezza picchi)

Questi parametri definiscono il limite di intensità inferiore per il livello di altezza del singolo picco all’inizio di Pyrogram.

“Required peak height for passed quality”
(Altezza di picco richiesta per ottenere la valutazione di qualità “Superata”)

Il valore di segnale minimo per un picco affinché raggiunga la valutazione di qualità “Passed” per le posizioni variabili.

Il valore predefinito è 20.

Nota: il valore non può essere inferiore al valore “Required peak height for check quality” (Altezza di picco richiesta per ottenere la valutazione di qualità “Controllare”, vedere sotto).

“Required peak height for check quality”
(Altezza di picco richiesta per ottenere la valutazione di qualità “Controllare”)

Il valore di segnale minimo per un picco affinché raggiunga la valutazione di qualità “Check” per le posizioni variabili. Durante l’analisi compare l’avvertenza “Uncertain due to low peak height” (Incerta per bassa altezza di picco).

Nota: questa regola è applicata solo se non viene soddisfatto il criterio per la valutazione di qualità “Passed”.

Il valore predefinito è 10.

Un valore di segnale per un picco che è inferiore al valore impostato determinerà una valutazione di qualità “Failed” (Non superata) per le posizioni variabili. Durante l’analisi compare l’avvertenza “Failed due to low peak height” (Non superata per altezza picco insufficiente).

Nota: il valore non può essere superiore al valore “Required peak height for passed quality” (vedere sopra).

**“Stringency levels”
(Livelli di stringenza)**

La stringenza delle avvertenze relative a “Pattern deviation in variable positions” (Deviazione pattern in posizioni variabili) e “Sum deviation in variable positions” (Deviazione somma in posizioni variabili) può essere impostata su “Low” (Bassa), “Normal” (Normale, predefinita), o “High” (Alta). Un elevato livello di stringenza restringe la deviazione ammessa.

“Pattern deviation in variable positions”
(Deviazione pattern in posizioni variabili)

La deviazione tra il pattern del picco misurato nella posizione variabile e il pattern del picco teorico.

Se la deviazione è superiore a quanto ammesso dal livello di stringenza impostato, durante l’analisi compare l’avvertenza “Uncertain/Failed due to high pattern deviation in variable position” (Valutazione di qualità incerta/non superata per elevata deviazione pattern durante l’analisi). Il fatto che l’avvertenza segnali una valutazione di qualità “Check” o “Failed” per il risultato di analisi dipende dall’entità della deviazione.

“Sum deviation in variable positions”
(Deviazione somme in posizioni variabili)

Deviazione tra la somma misurata su tutti i picchi nella posizione variabile e la somma teorica (in base alla singola altezza di picco).

Se la deviazione è superiore a quanto ammesso dal livello di stringenza impostato, durante l’analisi compare l’avvertenza “Uncertain/Failed due to high sum deviation in variable position” (Incerta/Non superata per elevata deviazione somma in posizione variabile). Il fatto che l’avvertenza segnali una valutazione di qualità “Check” o “Failed” per il risultato di analisi dipende dall’entità della deviazione.

Parametri

“A-peak reduction factor” (Fattore di riduzione picco A)

Fattore per cui vengono moltiplicate le intensità del picco A per rappresentare il fatto che i picchi A sono superiori agli altri picchi.

Il valore predefinito è 0,90.

Per ripristinare i parametri nelle schede “Variable Positions” e “Analysis Parameters” ai loro valori predefiniti, fare clic su “Revert to Default”.

Abilitazione o disabilitazione dei picchi di riferimento e dei controlli trattati con bisolfito.

I picchi non variabili (vale a dire picchi che non sono parte di una posizione variabile) vengono definiti “picchi di riferimento”. I picchi di riferimento vengono utilizzati nell’analisi sia come riferimenti nel calcolo del livello di altezza del singolo picco, che come controlli interni nella valutazione della qualità. Al fine di ottenere la migliore valutazione di qualità dei risultati, si raccomanda di mantenere abilitati i picchi di riferimento generati dal software.

Facendo clic con il pulsante sinistro del mouse su un rombo di un picco di riferimento nell’istogramma, il picco viene abilitato o disabilitato come picco di riferimento, in funzione dello stato precedente. Il rombo indica lo stato:

- Rombo blu pieno: abilitato come picco di riferimento.
- Rombo blu vuoto: disabilitato come picco di riferimento.

Facendo clic con il pulsante sinistro del mouse su un rombo di un controllo trattato con bisolfito (solo dosaggi CpG), il controllo viene abilitato o disabilitato come controllo e/o come picco di riferimento, in funzione dello stato precedente. Il rombo indica lo stato.

- Rombo arancione pieno: abilitato sia come controllo trattato con bisolfito che come picco di riferimento.


- Rombo blu pieno: abilitato come picco di riferimento ma disabilitato come controllo trattato con bisolfito.
- Rombo arancione vuoto: disabilitato sia come controllo trattato con bisolfito che come picco di riferimento.

Posizionando il puntatore del mouse sul rombo, verrà visualizzata la spiegazione della conseguenza di un clic.

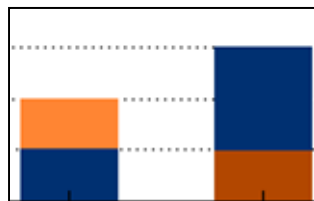
Nota: fare clic con il pulsante destro del mouse sull'istogramma e selezionare "Mostra picchi di riferimento" dal menu contestuale per nascondere/visualizzare i picchi di riferimento.

Regolazione delle altezze delle barre dell'istogramma

Questa funzione è utile quando esperimenti precedenti hanno mostrato una deviazione riproducibile nel pattern misurato rispetto al pattern teorico. Utilizzare questa funzione con cautela.

- 1. Premere e tenere premuto il tasto "Ctrl" facendo al contempo clic con il pulsante sinistro del mouse sulla barra dell'istogramma (fare clic con il pulsante sinistro del mouse quando il puntatore cambia da freccia bianca a ).**
- 2. Immettere l'altezza nella casella di testo che si apre, o aumentare o diminuire l'altezza usando le frecce accanto alla casella di testo.**
- 3. Per applicare una nuova altezza, premere "Enter".**

Nota: anziché rimuovere i pattern di metilazione "standard" dalla sequenza da analizzare, per esempio le metilazioni di C che non sono seguite da G, impostare le altezze attese di G a zero (0).

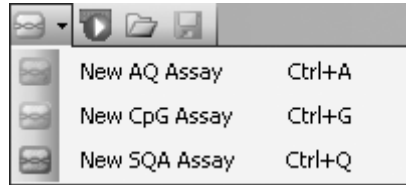




Arancione chiaro = altezza diminuita

Arancione scuro = altezza aumentata

Configurazione di un dosaggio SQA


Flusso di lavoro



1. Fare clic su  nella barra strumenti e selezionare "Nuovo dosaggio SQA". Viene creato un nuovo file di dosaggio.
2. Immettere il parametro "Dispensation Order" (vedere a pagina 34).
3. Opzionale: immettere informazioni sul dosaggio nella casella di testo "Assay Note" (Nota dosaggio).
4. Prima di elaborare i campioni, convalidare il dosaggio utilizzando un campione di DNA di riferimento, (vedere Appendice B del *Manuale utente PyroMark Q24 MDx*).
5. Opzionale: se applicabile, durante la convalida del dosaggio, modificare i parametri di analisi, vedere a pagina 34).
6. Opzionale: bloccare il dosaggio per impedirne la modifica facendo clic sul pulsante "Lock Assay" (Blocca dosaggio) nella parte inferiore della finestra di configurazione dosaggio. Un dosaggio bloccato () elaborato sullo Strumento PyroMark Q24 MDx non può essere sbloccato (vale a dire che non sarà possibile modificare i parametri o i risultati di analisi dopo l'elaborazione del dosaggio).

Nota: nel browser dei collegamenti, è possibile creare un nuovo file di dosaggio facendo clic con il pulsante destro del mouse sulla cartella in cui si intende posizionarlo e selezionando "New Assay" seguito dal tipo di dosaggio desiderato dal menu contestuale. Immettere il nome del file e premere "Enter". Per aggiungere un collegamento a una cartella o a un'unità, fare clic su "Add Folder Shortcut".

Nota: posizionando il puntatore del mouse sul file del dosaggio, viene visualizzata una nota sul dosaggio nel browser dei collegamenti.

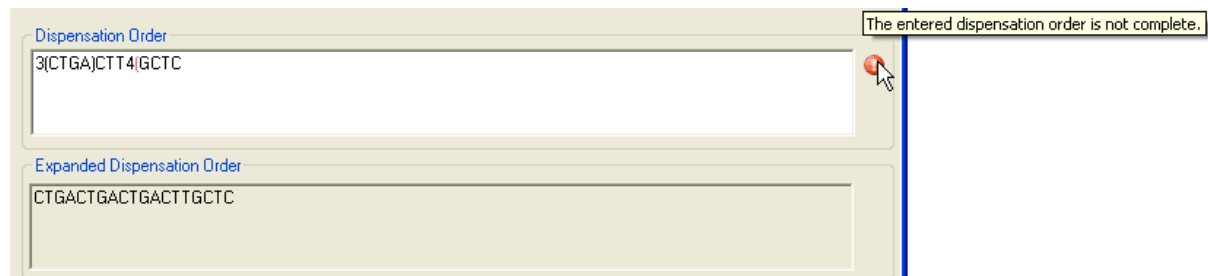
Nota: per salvare il file, fare clic su  nella barra strumenti. Se il file non è mai stato salvato, selezionare la posizione e immettere il nome file nella finestra di dialogo che si apre.

Immissione dell'ordine di dispensazione

Digitare o incollare ("Ctrl+V") l'ordine di dispensazione nella casella di testo "Dispensation Order". Le seguenti regole sono applicabili quando si immette l'ordine di dispensazione nel software:

- I caratteri ammessi per l'immissione sono A, C, G, e T.
- Per ripetere un gruppo di basi, usare i numeri in combinazione con le parentesi, per esempio "3(CTGA)" corrisponde a "CTGACTGACTGA".

Se l'ordine di dispensazione contiene un errore, questo è indicato da un punto esclamativo di colore rosso al termine della casella di testo. Posizionando il puntatore del mouse sul punto esclamativo, verrà visualizzata la spiegazione dell'errore. Il carattere (o più di uno) che ha causato l'errore sarà contrassegnato in rosso nell'ordine di dispensazione.



L'errore "The entered dispensation order is not complete" (L'ordine di dispensazione immesso è incompleto) è causato da una parentesi mancante o posizionata erroneamente. In questo esempio, manca una parentesi di chiusura.

Modifica dei parametri di analisi

Le impostazioni di analisi predefinite sono state impostate per fornire risultati di analisi ottimizzati per la maggior parte dei dosaggi. Opzionale: se applicabile, durante la convalida del dosaggio, modificare i parametri di analisi per ottimizzare i risultati.

- L'impostazione "Quality Control Window" (Finestra del controllo qualità) nella scheda "Settings" (Impostazioni) viene fissata come valore predefinito su 20. Se è richiesto un numero di basi superiore o inferiore, regolare di conseguenza.
- Modifica dei parametri di analisi nella scheda "Analysis Parameters"; vedere sotto.

Verificare che le modifiche vengano convalidate; vedere Appendice B di *Manuale utente PyroMark Q24 MDx*.

Nota: quando si usano kit QIAGEN, adottare le impostazioni riportate nei manuali dei rispettivi kit.

Nota: Tutte le modifiche salvate vengono memorizzate in un registro. Per visualizzare il registro delle modifiche di un dosaggio, aprire il file del dosaggio e fare clic su "Show Change Log" nella parte inferiore della finestra di configurazione del dosaggio.

Modifica dei parametri di analisi nella scheda "Analysis Parameters"

Nella scheda "Analysis Parameters", è possibile modificare i seguenti parametri di analisi.

"Peak height threshold" (Soglia altezza picchi)

Questi parametri definiscono il limite di intensità inferiore per il livello di altezza del singolo picco all'inizio di Pyrogram.

"Required peak height for passed quality"
(Altezza di picco richiesta per ottenere la valutazione di qualità "Superata")

Il valore di segnale minimo per un picco affinché raggiunga la valutazione di qualità "Passed" nella sequenza di basi.

Il valore predefinito è 10.

Nota: il valore non può essere inferiore al valore "Required peak height for check quality" (Altezza di picco richiesta per ottenere la valutazione di qualità "Controllare", vedere sotto).

"Required peak height for check quality"
(Altezza di picco richiesta per ottenere la valutazione di qualità "Controllare")

Il valore di segnale minimo per un picco affinché raggiunga la valutazione di qualità "Check" nella sequenza di basi. Durante l'analisi, compare l'avvertenza "Uncertain due to low peak height" (Incerta per bassa altezza di picco).

Nota: questa regola è applicata solo se non viene soddisfatto il criterio per la valutazione di qualità "Passed".

Il valore predefinito è 5.

Un valore di segnale per un picco che è inferiore al valore impostato determinerà una valutazione di qualità "Failed" per le posizioni variabili. Durante l'analisi compare l'avvertenza "Failed due to low peak height".

Nota: il valore non può essere superiore al valore "Required peak height for passed quality" (Altezza di picco richiesta per ottenere la valutazione di qualità "Superata", vedere sopra).

Parametri

| | |
|--|---|
| “A-peak reduction factor” (Fattore di riduzione picco A) | Fattore per cui vengono moltiplicate le intensità del picco A per rappresentare il fatto che i picchi A sono superiori agli altri picchi. Il valore predefinito è 0,90. |
| “Plus shift compensation” (Compensazione shift positivo) | Se questa opzione è selezionata, i picchi sono compensati per uno shift positivo. |
| “Minus shift compensation” (Compensazione shift negativo) | Se questa opzione è selezionata, i picchi sono compensati per uno shift negativo. |
| “Stringent homopolymer scoring” (Classificazione omopolimeri stringente) | Se è selezionata questa opzione, per la valutazione di qualità degli omopolimeri vengono usate regole più severe. Durante l’analisi compare l’avvertenza “Peak height deviates from the expected peak level at dispensation: <i>number(s)</i> ” (L’altezza del picco devia dal livello di picco previsto alla dispensazione: <i>numero(i)</i>) |

Basi note

Se nell’ordine di dispensazione sono comprese basi note, si raccomanda di immettere questo dato per ottimizzare l’analisi:

1. Fare clic con il pulsante sinistro del mouse nell’ordine di dispensazione e immettere l’altezza nella casella di testo che si apre, o aumentare o diminuire l’altezza usando le frecce accanto alla casella di testo.
2. Per applicare l’altezza, premere “Enter”.


Per ripristinare i parametri nelle schede “Settings” e “Analysis Parameters” (Parametri analisi) ai loro valori predefiniti, fare clic su “Revert to Default” (Ripristina predefiniti).

Configurazione di un processo

Flusso di lavoro

1. Fare clic su  nella barra strumenti. Viene creato un nuovo file di processo.

2. **Immettere i parametri di processo (vedere a pagina 38).**
3. **Configurare la piastra (vale a dire, aggiungere un dosaggio ed eventualmente immettere un ID campione e una nota per ogni pozzetto usato); vedere a pagina 39.**
4. **Quando il processo è configurato e pronto per essere elaborato sullo Strumento PyroMark Q24 MDx:**

Per stampare la configurazione della piastra e un elenco dei volumi richiesti della miscela enzimatica, di substrato e di nucleotidi, selezionare "Pre Run Information" dal menu "Tools" (Strumenti) e, quando si apre il report, fare clic su .


Chiudere il file di processo e copiarlo su una delle penne USB fornite in dotazione con il sistema usando Windows Explorer. Per aprire Windows Explorer, fare clic con il pulsante destro del mouse sulla cartella contenente il file di processo nel browser dei collegamenti e selezionare "Explore" (Esplora) dal menu contestuale. Per ulteriori informazioni, premere il tasto "F1" per aprire la guida in linea di Windows.

Per eseguire l'elaborazione della piastra sullo Strumento PyroMark Q24 MDx, vedere a pagina 44.

Nota: Per stampare il report "Pre Run Information" a colori, attivare l'opzione "Print background colors and images" (Stampa immagini e colori di sfondo) in Internet Explorer ("Tools/Internet Options/Advanced/Printing") (Strumenti/Opzioni Internet/Avanzate/Stampa).

Nota: è possibile creare un nuovo file di processo nel browser dei collegamenti facendo clic con il pulsante destro del mouse sulla cartella desiderata e selezionando "New Run" dal menu contestuale. Immettere il nome del file e premere "Enter". Per aggiungere un collegamento a una cartella o a un'unità, fare clic su "Add Folder Shortcut".

Nota: per basare l'elaborazione su un processo precedente, fare clic con il pulsante destro del mouse nel file sottoposto ad elaborazione nel browser dei collegamenti e selezionare "Copy and Rerun" (Copia e ripeti processo) dal menu contestuale. Verrà copiata solo la configurazione del processo, non il processo e i dati di analisi.

Nota: per salvare il file, fare clic su  nella barra strumenti. Se il file non è mai stato salvato, selezionare la posizione e immettere il nome file nella finestra di dialogo che si apre.

Immissione dei parametri di processo

Sono disponibili i seguenti parametri di processo.

| | |
|--|--|
| “Run name” (Nome processo) | Nome del processo che viene conferito al momento del salvataggio del file. Il nome del processo si modifica anche rinominando il file. |
| “Instrument method” (Metodo strumento) | Selezionare il metodo dello strumento in base ai reagenti e alla cartuccia reagenti che saranno utilizzati per il processo (vedere Gestione dei metodi dello strumento, pagina 62). Nota: si raccomanda di utilizzare solo metodi forniti da QIAGEN. |
| “Plate ID” (ID piastra) | Opzionale: immettere l’ID della Piastra PyroMark Q24. Nota: posizionando il puntatore del mouse su un file di processo nel browser dei collegamenti, viene visualizzata una descrizione comando che descrive l’ID piastra riportato. |
| “Barcode” (Codice a barre) | Opzionale: immettere un numero di codice a barre per la piastra o, se si dispone di un lettore di codice a barre collegato al computer, posizionare il cursore del mouse nella casella di testo “Barcode” e scansionare il codice a barre. |
| “Reagent ID” (ID Reagente) | Opzionale: immettere il numero di lotto dei Reagenti PyroMark Gold Q24 da utilizzare. Il numero di lotto è reperibile sull’etichetta del prodotto. Nota: si raccomanda di immettere l’ID dei reagenti in modo da poter tenere traccia di eventuali problemi inaspettati con i reagenti. |
| “Estimated run time” (Tempo stimato di processo) | Il tempo stimato di processo. |
| “Run note” (Nota processo) | Opzionale: immettere una nota sui contenuti o sullo scopo del processo. |

Aggiunta di file di dosaggio alla piastra

Per aggiungere un dosaggio a un pozzetto, è possibile procedere in uno dei seguenti modi:

- Selezionare il dosaggio nel browser dei collegamenti e tenere premuto il pulsante sinistro del mouse trascinando al contempo il dosaggio nel pozzetto
- Fare clic con il pulsante destro del mouse sul pozzetto e selezionare "Load Assay" (Carica dosaggio) dal menu contestuale.

Nota: per aggiungere un dosaggio a più pozzetti, selezionare i pozzetti (per aggiungere un dosaggio a più pozzetti, selezionare i pozzetti (vedere Selezione dei pozzetti, pagina 18) e trascinare il dosaggio sulla selezione.

Nota: non è possibile aggiungere un dosaggio senza ordine di dispensazione o aggiungere due o più dosaggi con lo stesso nome ma con ordini di dispensazione diversi.

| Plate Setup | | | | | | |
|-------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| A | AQ assay 1 | AQ assay 2 | CpG assay 1 | CpG assay 2 | SQA assay 1 | SQA assay 2 |

Un pozzetto è colorato in base al dosaggio che vi è stato caricato.

Immissione di ID e note sul campione

- Per immettere un ID campione o una nota, selezionare la cella (vedere immagine sotto) e immettere il testo.
- Per modificare un ID o una nota del campione, selezionare la cella (i contenuti correnti verranno selezionati) o fare doppio clic sulla cella.
- Per importare il layout di un campione e una nota definiti in un file di testo (*.tsv o *.csv), fare clic con il pulsante destro del mouse su un pozzetto e selezionare "Insert Sample Layout File" (Inserisci file layout campione) dal menu contestuale. Per ulteriori informazioni, vedere Definizione di un ID campione e di una nota esternamente, pagina 42.
- Per incollare il layout di un campione dagli appunti, fare clic con il pulsante destro del mouse su un pozzetto e selezionare "Paste Sample Layout" (Incolla layout campione) dal menu contestuale. Per esempio, vedere Definizione di un ID campione e di una nota esternamente, pagina 42.

Nota: virgola e punto e virgola non sono supportati.

| | |
|------------|------------|
| Assay Name | Assay Name |
| Sample ID | Sample ID |
| Note | Note |

Una cella selezionata viene evidenziata con un colore azzurro di fondo.

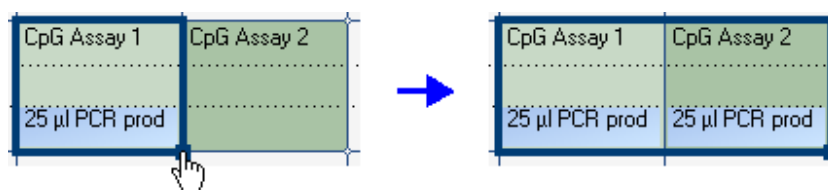
Copia o eliminazione di contenuti dalle celle

- Per tagliare i contenuti di una cella negli appunti, fare clic con il pulsante destro del mouse sulla cella e selezionare "Cut" (Taglia) dal menu contestuale.
- Per copiare i contenuti di una cella negli appunti, fare clic con il pulsante destro del mouse sulla cella e selezionare "Copy cell" (Copia cella) dal menu contestuale o selezionare la cella e premere "Ctrl+C".
- Per incollare gli appunti in una cella o in una selezione di celle (vedere Selezione dei pozzetti, pagina 18), fare clic con il pulsante destro del mouse sulla cella o sulla selezione di celle e selezionare "Paste" (Incolla) dal menu contestuale o selezionare la cella(e) e premere "Ctrl+V".
- Per eliminare uno o più dosaggi, ID campione o note, fare clic con il pulsante destro del mouse sulla cella o sulla selezione di celle e selezionare "Delete" (Elimina) dal menu contestuale o selezionare la cella(e) e premere "Delete".

Funzione "trascina e rilascia" per copiare i contenuti di una cella in altri pozzetti

Per trascinare e rilasciare i contenuti di una cella in altri pozzetti:

1. **Selezionare la cella che si intende copiare.**
2. **Posizionare il puntatore del mouse nel riquadro inferiore destro della selezione e tenere premuto il pulsante destro del mouse muovendo al contempo il mouse per modificare la selezione.**
3. **Rilasciando il pulsante sinistro del mouse, i contenuti della prima cella selezionata vengono copiati nelle celle selezionate.**



Funzione "trascina e rilascia" della nota "25 µl PCR prod" (prod. PCR 25 µl).

Funzione “trascina e rilascia” per copiare un ID campione incrementale

Se l’ultima parte di un ID campione immesso è un numero, il numero può essere incrementato quando si copia l’ID campione trascinandolo:

1. Selezionare la cella ID campione.

2. Per incrementare per riga:

Posizionare il puntatore del mouse sul riquadro inferiore destro della selezione.

Tenere premuto il tasto “Ctrl” + pulsante sinistro del mouse spostando al contempo il mouse per modificare la selezione.

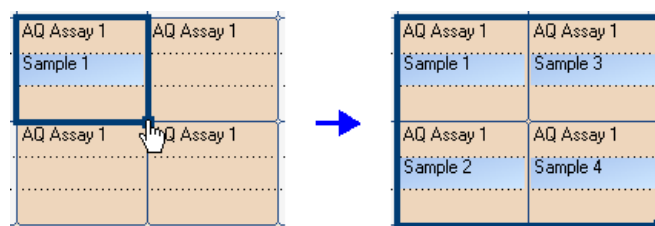
Rilasciare innanzitutto il pulsante sinistro del mouse, poi il tasto “Ctrl”. Rilasciando il pulsante sinistro del mouse, l’ID campione della prima cella selezionata viene incrementato e incollato nelle celle selezionate.

3. Per incrementare per colonna:

Posizionare il puntatore del mouse sul riquadro inferiore destro della selezione.

Tenere premuti i tasti “Shift” e “Ctrl” + pulsante sinistro del mouse spostando al contempo il mouse per modificare la selezione.

Rilasciare innanzitutto il pulsante sinistro del mouse, poi i tasti “Shift” e “Ctrl”. Rilasciando il pulsante sinistro del mouse, l’ID campione della prima cella selezionata viene incrementato e incollato nelle celle selezionate.



Incremento per colonna dell’ID campione “Sample 1” (Campione 1)

Stampa o esportazione della configurazione piastra come immagine

La “Plate Setup” (Configurazione piastra) può essere stampata o copiata come immagine (negli appunti) facendo clic con il pulsante destro del mouse sulla piastra e selezionando “Print” (Stampa) o “Copy as Image” (Copia come immagine) dal menu contestuale. L’immagine può essere incollata nelle applicazioni che supportano immagini Enhanced Metafile (EMF).

Definizione di un ID campione e di una nota esternamente

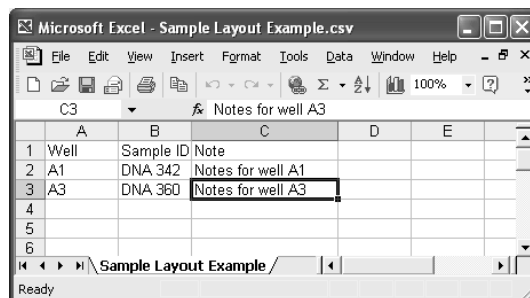
Le funzioni "Import/Insert Sample Layout File" (Importa/Inserisci file layout campione) o "Paste Sample Layout" consentono di usare facilmente lo stesso layout in più processi e di riutilizzare le informazioni disponibili nella documentazione esistente.

Utilizzo della funzione importazione/inserimento di file del layout di un campione

Questa funzione consente per esempio di generare file di layout da Laboratory Information Management Systems (LIMS). I file di layout di campioni e note possono essere creati anche in Microsoft Excel, Blocco note e applicazioni simili. Il file di layout deve avere due o tre colonne: "Well" (Pozzetto), "Sample ID" (ID campione) e "Note" (Nota) (opzionale). Ogni colonna deve essere separata da una tabulazione, una virgola o un punto e virgola, e ogni riga deve essere delimitata da un "a capo". Salvare il file come un file di testo delimitato da tabulazioni o virgole (*.tsv, *.txt o *.csv).

Il file del campione e del layout possono essere importati in:

- Un file di processo esistente facendo clic col pulsante destro del mouse su un pozzetto in "Plate Setup" e selezionando "Insert Sample Layout File" (Inserisci file layout campione) dal menu contestuale
- Un nuovo file di processo selezionando "Import" seguito da "Create New Run from Sample Layout File".



| | A | B | C | D | E |
|---|------|-----------|-------------------|---|---|
| 1 | Well | Sample ID | Note | | |
| 2 | A1 | DNA 342 | Notes for well A1 | | |
| 3 | A3 | DNA 360 | Notes for well A3 | | |
| 4 | | | | | |
| 5 | | | | | |
| 6 | | | | | |

Esempio di file del layout di un campione e nota creato in Microsoft Excel.



| | 1 | 2 | 3 |
|----|-------------------|---|-------------------|
| A | DNA 342 | | DNA 360 |
| A3 | Notes for well A1 | | Notes for well A3 |

Risultato dell'importazione del file di layout di un campione e nota di cui sopra.

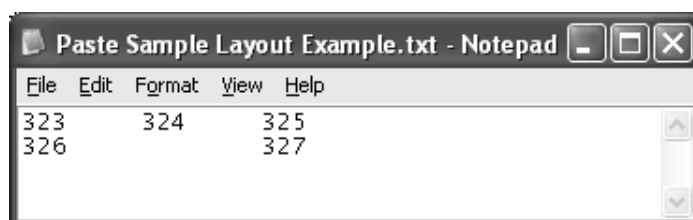
Utilizzo della funzione "Incolla" del layout campione

Questa funzione consente per esempio di generare e copiare layout da LIMS. I layout del campione possono essere copiati da Microsoft Excel, Word, Blocco note e applicazioni simili. Nel file sorgente, ogni colonna degli ID campione deve essere delimitata da una tabulazione e ogni riga degli ID campione deve essere delimitata da un "a capo".

Per incollare il layout di un campione in un file di processo esistente:

- 1. Copiare tutte le informazioni nel file sorgente.**
- 2. Fare clic col pulsante destro del mouse su un pozzetto in "Plate Setup" e selezionare "Paste Sample Layout" dal menu contestuale.**

Il software incollerà gli ID campione nella piastra, a partire dal pozzetto A1. (Se nei pozzetti sono state inserite delle note, queste vengono mantenute).



Esempio di layout di un campione creato in Blocco note di Microsoft.

| Plate Setup | | | |
|-------------|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 |
| A | 323 | 324 | 325 |
| B | 326 | | 327 |

Risultato della funzione di "Copia e incolla" del layout del campione creato in Blocco note di Microsoft.

Controllo della configurazione piastra

L'area "Well Information" (Informazioni pozzetto) mostra le seguenti informazioni su un pozzetto selezionato in "Plate Setup":

- Nome pozzetto
- Tipo di dosaggio (AQ, CpG o SQA)
- Nome dosaggio
- ID campione (se immesso)
- Sequenza da analizzare (dosaggi AQ e CpG)

- Ordine di dispensazione
- Nota pozzetto (se immessa).

Se in "Plate Setup" sono selezionati più pozzetti, vengono visualizzate le informazioni per il primo pozzetto selezionato.

Esecuzione di un processo sullo Strumento PyroMark Q24 MDx

Flusso di lavoro

Quando il processo è configurato e pronto per essere elaborato sullo Strumento PyroMark Q24 MDx, procedere come segue:

- 1. Preparare i campioni.**
- 2. Caricare la Cartuccia PyroMark Q24 con i volumi di reagenti richiesti.**
- 3. Caricare la cartuccia reagenti e la piastra PyroMark Q24 sullo strumento.**
- 4. Inserire la penna USB contenente il file da elaborare nella porta USB sul lato anteriore dello strumento.**
- 5. Selezionare il file da elaborare e avviare il processo.**
- 6. Una volta completato il processo e al termine del trasferimento dei dati sulla penna USB, rimuovere la penna USB.**
- 7. Scaricare la piastra e la cartuccia reagenti.**

Per ulteriori informazioni, vedere la Sezione 5.5 del *Manuale utente PyroMark Q24 MDx*.

Analisi del processo

Flusso di lavoro

1. Trasferire il file di processo elaborato dalla penna USB a un computer dotato del Software PyroMark Q24 MDx; inserire la penna USB nella porta USB del computer e trasferire il file di processo nella posizione desiderata attraverso Windows Explorer.
2. Aprire il file di processo nel Software PyroMark Q24 MDx selezionando "Open" nel menu "File" o facendo doppio clic sul file (☑) nel browser dei collegamenti. Se sono inclusi vari tipi di dosaggi, selezionare la modalità di analisi nella finestra di dialogo che si apre.

Nota: per aggiornare i contenuti di una cartella nel menu dei collegamenti, farvi clic sopra con il pulsante destro del mouse e selezionare "Refresh" (Aggiorna) dal menu contestuale.

Nota: è inoltre possibile aprire il file di processo facendovi sopra doppio clic in Windows Explorer.

3. Analizzare il processo (vedere di seguito).
4. Visualizzare i risultati di analisi (vedere a pagina 46).
5. Opzionale: se applicabile, modificare i parametri di analisi, vedere a pagina 50).
6. Opzionale: immettere una nota sull'analisi nella casella di testo "Note", nella scheda "Overview" (Panoramica).

Nota: per espandere o comprimere il campo "Note", fare clic su "+" o "-".

7. Per salvare i risultati di analisi, fare clic su  nella barra strumenti.

Nota: non è possibile modificare i parametri di analisi o immettere una nota sull'analisi per un dosaggio bloccato (🔒).

Analisi di tutti i pozzetti o dei pozzetti selezionati

Dalla scheda "Overview" esistono due metodi per eseguire l'analisi:



Analizzare tutti i pozzetti con una configurazione di analisi valida per la modalità di analisi corrente.



Analizzare i pozzetti selezionati (Selezione dei pozzetti, a pagina 18).

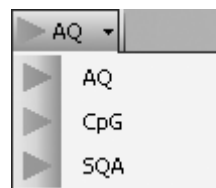
Nota: è inoltre possibile fare clic con il pulsante destro del mouse sulla selezione e selezionare "Analyze selected" (Analizza selezionati) dal menu contestuale.

Durante l'analisi, viene visualizzata una finestra di dialogo che riporta l'avanzamento del processo. Tale finestra contiene una barra di avanzamento, un pulsante di arresto e il nome del pozzetto correntemente analizzato. Per arrestare l'analisi, fare clic su "Stop".

Nota: una volta analizzato, il colore del pozzetto diventa azzurro.

Modalità di analisi

Il Software PyroMark Q24 MDx presenta tre modalità di analisi: AQ, CpG, e SQA. Per passare da una modalità all'altra, selezionare "AQ", "CpG", o "SQA" nella barra strumenti. Per accedere alla genotipizzazione di SNP e InDel (inserzioni/delezioni), aprire il menu "Reports" (Report) in modalità AQ.



Nota: poiché la modalità CpG non supporta l'analisi automatica di SNP, le percentuali di metilazione e le valutazioni di qualità sono determinate solo per i siti CpG. Gli SNP in un dosaggio CpG possono essere analizzati in modalità AQ utilizzando la sequenza da analizzare impiegata nella configurazione CpG. Per escludere i siti CpG nei report SNP, selezionare la scheda "Analysis Setup" (Configurazione analisi) e deselegionare l'opzione "Analyze" per queste posizioni nella scheda "Variable Positions".

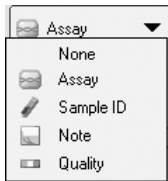
Visualizzazione dei risultati di analisi

Selezionando un pozzetto analizzato (di colore azzurro) nella scheda "Overview", viene visualizzato il pirogramma corrispondente nell'area Pyrogram e le informazioni del pozzetto (incluse le avvertenze sull'analisi) sono elencate nell'area "Well information" (Informazioni pozzetto). Nota: se nella panoramica della piastra sono selezionati più pozzetti, vengono visualizzate le informazioni relative al pozzetto nel riquadro di selezione arancione.

Recupero di una panoramica dei risultati

La panoramica della piastra nella scheda "Overview" riporta le seguenti informazioni sui pozzetti:

Dosaggi AQ



Selezionare per mostrare il nome del dosaggio.



Selezionare per mostrare l'ID campione.

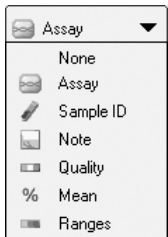


Selezionare per mostrare una nota sul pozzetto.



Selezionare per mostrare la barra del livello qualità. Tale barra mostra la valutazione di qualità di tutte le posizioni variabili del pozzetto o di tutte le basi della sequenza. Vedere la legenda dei colori a pagina 48.

Dosaggi CpG

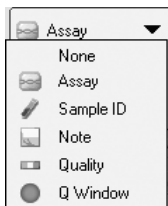


Selezionare per mostrare la percentuale di metilazione media di tutti i siti CpG nel pozzetto.



Selezionare per mostrare la barra di metilazione. La barra di metilazione mostra il livello di metilazione per ciascun sito CpG nel pozzetto. Vedere la legenda dei colori a pagina 49.

Dosaggi SQA



Selezionare per mostrare la valutazione di qualità al termine della finestra di controllo qualità. Come impostazione predefinita, sono incluse 20 basi.

Nota: i pozzetti con un elevato picco di substrato saranno contrassegnati da un'icona informativa (i) nella panoramica della piastra. Questo non comprometterà le valutazioni di qualità.

Nota: se parametri di analisi, valutazioni di qualità o risultati di analisi (solo dosaggi SQA) sono stati modificati dall'utente, il pozzetto pertinente sarà contrassegnato da un'icona di avvertenza (⚠).

Nota: se un dosaggio è bloccato, il pozzetto sarà contrassegnato dall'icona (🔒).

Stampa o esportazione della panoramica della piastra come immagine

La panoramica della piastra può essere stampata o copiata come immagine (negli appunti) facendo clic con il pulsante destro del mouse sulla panoramica della piastra e selezionando "Print" o "Copy as Image" dal menu contestuale. L'immagine può essere incollata nelle applicazioni che supportano immagini Enhanced Metafile (EMF).

Avvertenze sull'analisi

Selezionando un pozzetto analizzato (di colore azzurro), le eventuali avvertenze sull'analisi vengono elencate nell'area "Well information". Un'avvertenza sull'analisi riguarda la valutazione di qualità, e in particolare:

- Dosaggi AQ e CpG: riguarda la valutazione di qualità di tutte le posizioni variabili o di una singola posizione. Se sono state attivate più avvertenze dello stesso tipo, nell'area "Well Information" vengono visualizzate solo le più importanti.
- Dosaggi SQA: riguarda la valutazione di qualità dell'intera sequenza o a partire da una determinata dispensazione. Nell'area "Well Information" vengono visualizzate tutte le avvertenze attivate all'interno della finestra del controllo qualità.

Per alcune avvertenze, i criteri di occorrenza e l'effetto sulla valutazione di qualità possono essere modificati dall'utente nella scheda "Analysis Parameters", vedere "Modifica dei parametri di analisi" a pagina 50.

Nota: se si verifica un errore di dispensazione, si raccomanda di sostituire la cartuccia reagenti.

Valutazioni della qualità

Le valutazioni della qualità dei risultati di analisi sono visualizzate mediante:

- Barre qualità (▬) nella panoramica della piastra, vedere pagina 47.
- Colore di fondo dei risultati di analisi (le frequenze alleliche o le percentuali di metilazione in Pyrogram, per esempio 96% o la sequenza di basi); vedere a pagina 47.
- Finestre del controllo qualità (●) nella panoramica della piastra; vedere a pagina 47 (solo dosaggi SQA).
- I picchi nel Pyrogram compensato sono colorati conformemente alla valutazione della qualità (solo dosaggi SQA).

Colori indicanti la qualità

- Blu: controllo superato
- Giallo: controllare
- Rosso: controllo non superato
- Bianco: non analizzato. L'analisi potrebbe non essere supportata dal software (per esempio l'analisi di SNP in modalità CpG) o la posizione variabile potrebbe essere stata deselezionata dall'utente (solo dosaggi AQ e CpG).

Livelli di metilazione

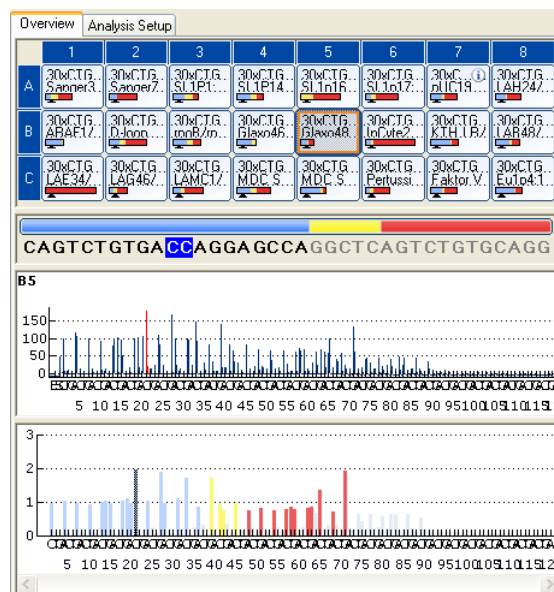
In modalità CpG, una barra della metilazione nella scheda "Overview" della piastra mostra il livello di metilazione di ogni sito CpG nel pozzetto (vedere a pagina 47).

Colori della metilazione

- Verde chiaro: al di sotto del range previsto
- Verde: all'interno del range previsto
- Verde scuro: al di sopra del range previsto

Visualizzazione e confronto dei Pyrogram

Selezionando un pozzetto analizzato nella scheda "Overview", vengono visualizzati il Pyrogram e l'istogramma teorico corrispondenti (in presenza di un dosaggio AQ o CpG) o un Pyrogram compensato (in presenza di un dosaggio SQA).



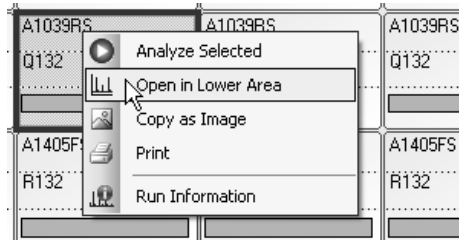
Quando si seleziona una base nella sequenza di basi, il picco corrispondente viene evidenziato in entrambe le aree di Pyrogram e vice versa.

Confronto dei Pyrogram di pozzetti diversi


Per confrontare il Pyrogram di un pozzetto specifico (visualizzato nell'area superiore) con quello di uno o più pozzetti (visualizzato nell'area inferiore), procedere come segue:

1. Nella scheda "Overview", selezionare il pozzetto o i pozzetti (vedere **Selezione dei pozzetti, a pagina 18**) che si intende aprire nell'area inferiore.

2. Fare clic con il pulsante destro del mouse sulla selezione e selezionare "Open in Lower Area" (Apri in area inferiore) dal menu contestuale.
3. Selezionare il pozzetto che si intende aprire nell'area inferiore.



Se nell'area inferiore sono visualizzati i Pyrogram di più pozzetti, usare la barra di scorrimento per passare da un Pyrogram all'altro.

È possibile ingrandire contemporaneamente un Pyrogram con la stessa sequenza da analizzare (applicando cioè lo zoom collegato) facendo clic su  nell'angolo in alto a destra dell'area superiore.

Per chiudere l'elenco dei pirogrammi nell'area inferiore, fare clic su **x** nell'angolo in alto a destra.


Ingrandimento dei Pyrogram e visualizzazione della descrizione di icone e colori

Per informazioni su icone e colori utilizzati nell'area Pyrogram e istruzioni di ingrandimento, vedere Pyrogram, pagina 16.

Modifica dei parametri di analisi

Le impostazioni di analisi predefinite sono state impostate per fornire risultati di analisi ottimizzati per la maggior parte dei dosaggi. In caso di modifica di queste impostazioni, verificare che le modifiche vengano convalidate (vedere Appendice B di *Manuale utente PyroMark Q24 MDx*).

Nota: quando si usano kit QIAGEN, adottare le impostazioni riportate nei manuali dei rispettivi kit.

Nota: non è possibile modificare i parametri di analisi o immettere una nota sull'analisi per un dosaggio bloccato (.

1. **Selezionare il pozzetto o i pozzetti (vedere Selezione dei pozzetti, pagina 18) per cui si intende modificare i parametri di analisi.**

Nota: le modifiche saranno applicate solo ai pozzetti che condividono lo stesso dosaggio e ordine di dispensazione del pozzetto visualizzato. Per modificare i parametri di analisi per tutti i pozzetti con lo stesso dosaggio e ordine di dispensazione, è sufficiente selezionare solo uno dei pozzetti.


2. **Modificare dei parametri di analisi nella scheda "Analysis Parameters":**

Per abilitare o disabilitare le posizioni variabili e/o modificare i range di metilazione previsti (solo dosaggi CpG), vedere Configurazione delle posizioni variabili, pagina 25. Per modificare altri parametri di analisi per un dosaggio AQ o CpG, vedere a pagina 27.

Per modificare i parametri di analisi per un dosaggio SQA, vedere a pagina 34.

Nota: non è possibile modificare il nome di un dosaggio, l'ordine di dispensazione o la nota sul dosaggio.

3. Al termine, fare clic su **“Apply” (Applica)**.

Nota: è inoltre possibile abilitare o disabilitare picchi di riferimento e/o controlli trattati con bisolfito (solo dosaggi CpG) in Pyrogram nella schermata **“Overview”** (Panoramica, vedere istruzioni a pagina 31). Per applicare le modifiche apportate in Pyrogram, fare clic sul pulsante  verde. Questo pulsante è abilitato quando viene apportata una modifica.


4. Nella finestra di dialogo **“Apply Analysis Setup” (Applica configurazione analisi)**, applicare le modifiche a tutti i pozzetti o ai pozzetti selezionati:

Per applicare le modifiche a tutti i pozzetti che condividono lo stesso dosaggio e ordine di dispensazione del pozzetto visualizzato (per esempio tutti i pozzetti bianchi nella finestra di dialogo **“Apply Analysis Setup”**), fare clic su **“To All”** (A tutti).

Per applicare le modifiche a tutti i pozzetti selezionati (per esempio i pozzetti bianchi selezionati nella finestra di dialogo **“Apply Analysis Setup”**), fare clic su **“Selected”** (Selezionati).

Durante l'analisi, viene visualizzata una finestra di dialogo sull'avanzamento. Tale finestra contiene una barra di avanzamento, un pulsante di arresto e il nome del pozzetto correntemente analizzato. Per arrestare l'analisi, fare clic su **“Stop”**.

5. Per salvare le modifiche, fare clic su .

Nota: se parametri di analisi, valutazioni di qualità o risultati di analisi (solo dosaggi SQA) sono stati modificati dall'utente, il pozzetto pertinente sarà contrassegnato da un'icona di avvertenza () nella scheda **“Overview”**.

Nota: tutte le modifiche vengono memorizzate nel registro. Per visualizzare il registro di analisi per un pozzetto selezionato, selezionare **“Analysis Log”** dal menu **“Tools”**.

Uso di un dosaggio modificato in altri processi

Le modifiche apportate nella scheda **“Analysis Setup”** non saranno salvate nel file del dosaggio originale. Per utilizzare il dosaggio modificato in altri processi:

1. **Selezionare un pozzetto che sta usando un dosaggio modificato e fare clic su "Save Assay" (Salva dosaggio). Si apre la finestra di dialogo "Save Assay As" (Salva dosaggio con nome).**
2. **Salvare le modifiche apportate al file originale o salvare il dosaggio modificato come nuovo file:**

Selezionare la destinazione (cartella) dall'elenco a discesa "Save in" (Salva in).

Immettere il nome file nella casella di testo "File name" e fare clic su "Save".

Modifica delle valutazioni di qualità

Per modificare la valutazione di qualità di una frequenza allelica o di una percentuale di metilazione, fare clic con il pulsante sinistro del mouse sul risultato di analisi in Pyrogram e selezionare "Passed", "Check", o "Failed" dal menu contestuale.

Per modificare la valutazione di qualità di una sequenza di basi, posizionare il puntatore del mouse sull'estremità sinistra o destra dell'area "Passed", "Check", o "Failed", in modo tale che il puntatore si modifichi da freccia bianca a \pm , e spostare il mouse verso sinistra o verso destra tenendo al contempo premuto il pulsante sinistro del mouse.



Se una valutazione di qualità è stata modificata dall'utente, questa azione è visualizzata da un'icona di avvertenza (⚠) nella panoramica della piastra nella scheda "Overview", un'avvertenza nell'area "Well Information" e, in caso di un dosaggio AQ o CpG, in Pyrogram compare un bordo attorno al risultato di analisi (per esempio 44%).

Nota: tutte le modifiche vengono memorizzate nel registro. Per visualizzare il registro di analisi per un pozzetto selezionato, selezionare "Analysis Log" dal menu "Tools".

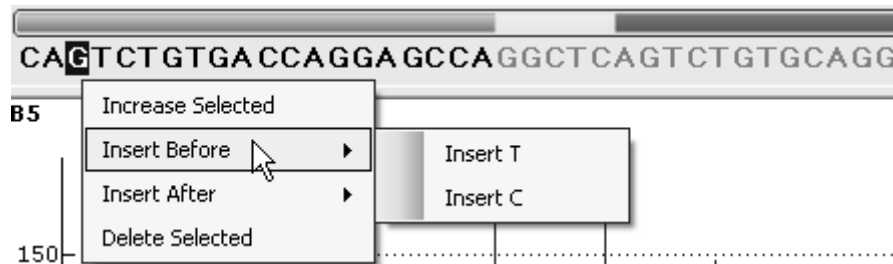
Nota: le valutazioni di qualità generate dal software sono basate su algoritmi di analisi avanzate. Si sconsiglia di modificare le valutazioni di qualità.

Nota: non è possibile modificare le valutazioni di qualità per un dosaggio bloccato (🔒).

Nota: le modifiche apportate in modalità AQ non si ripercuoteranno sulle valutazioni di qualità nei report SNP.

Sequenze di basi

Per modificare una sequenza di basi, farvi clic sopra con il pulsante destro del mouse e selezionare l'opzione desiderata.



Nota: tutte le modifiche vengono memorizzate nel registro. Per visualizzare il registro di analisi per un pozzetto selezionato, selezionare "Analysis Log" dal menu "Tools".

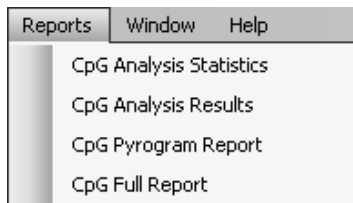
Nota: se si modifica una sequenza di basi, si noti che le valutazioni di qualità continuano ad essere basate sulla sequenza originale (la sequenza richiamata dal software). Per modificare le valutazioni di qualità, vedere a pagina 52.

Nota: non è possibile modificare le sequenze di basi per un dosaggio bloccato (🔒).

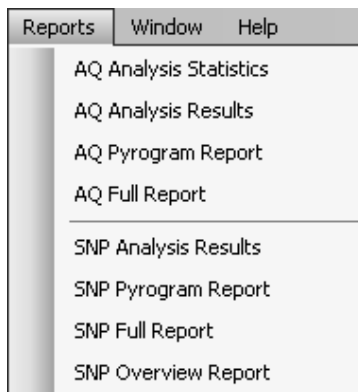
Visualizzazione, stampa e salvataggio dei report di analisi

Il Software PyroMark Q24 MDx offre i seguenti report di analisi per i processi elaborati.

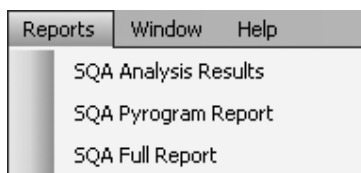
Report per processi CpG



Report per processi AQ



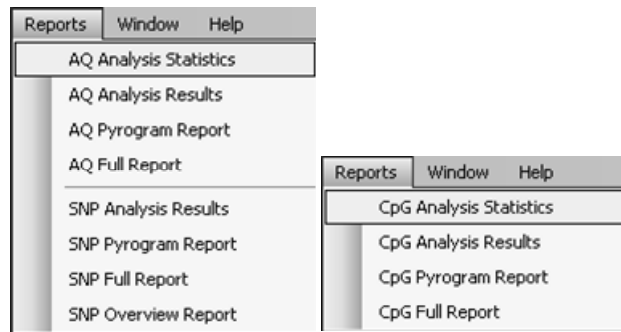
Report per processi SQA



- Report "Analysis Statistics". Include le statistiche dell'analisi per tutti i pozzetti o per quelli selezionati.
- Report "Analysis Results". Include le informazioni sui pozzetti e i risultati di analisi per tutti i pozzetti o per quelli selezionati.
- Report "Pyrogram" (Pirogramma). Include le informazioni sui pozzetti e su Pyrogram per tutti i pozzetti o per quelli selezionati.
- Full Report (Report completo). Include i parametri di processo, il registro di processo, le informazioni dei pozzetti e i risultati di analisi (incluso Pyrogram) per tutti i pozzetti o per quelli selezionati.
- SNP Overview Report (Report panoramica SNP). Include i genotipi e le valutazioni di qualità di tutti gli SNP e InDel (Inserzioni/Delezioni). Le informazioni sono presentate nelle panoramiche della piastra con una piastra per numero di posizione.

Nota: per visualizzare i report generati in formato PDF, sul computer deve essere installato un programma di lettura PDF. Adobe® Reader® può essere scaricato all'indirizzo www.adobe.com.

Report “Analysis Statistics”



Il report “Analysis Statistics” include le seguenti informazioni per le posizioni variabili in tutti i pozzetti o per quelli selezionati (vedere Selezione dei pozzetti, a pagina 18):

- La frequenza allelica media (report AQ) o la percentuale di metilazione media (report CpG)
- Le frequenze alleliche più alta e più bassa (report AQ) o percentuale di metilazione (report CpG)
- La deviazione standard
- Il numero di valori e pozzetti utilizzati in ogni calcolo
- Se i parametri di analisi o le valutazioni di qualità sono stati modificati dall’utente, i pozzetti pertinenti saranno elencati all’inizio del report.

Il report può essere salvato come file di testo (*.tsv o *.csv) o file HTML (.html). Il report può essere importato in Microsoft Excel o altre applicazioni in grado di gestire i file di testo (*.tsv o *.csv) con dati separati da punto e virgola (;) o schede. Questo è utile quando si fanno ulteriori calcoli sui dati.

Opzioni del report

Nella finestra di dialogo “Analysis Statistics Report” (Report analisi statistiche) compaiono le seguenti opzioni:

“All wells/Selected wells” (Tutti i pozzetti/Pozzetti selezionati) I pozzetti da includere nel report.

“Assay/Assay and sample ID”
(Dosaggio/Dosaggio e ID campione)

Le statistiche sui risultati di analisi possono essere raggruppate in base a:

- “Assay” (Dosaggio)
Saranno raggruppati i pozzetti con lo stesso dosaggio.
- “Assay and sample ID” (Dosaggio e ID campione)
Saranno raggruppati i pozzetti con lo stesso dosaggio e ID campione. Questa opzione può essere utile nell’esecuzione di esperimenti con replicati.

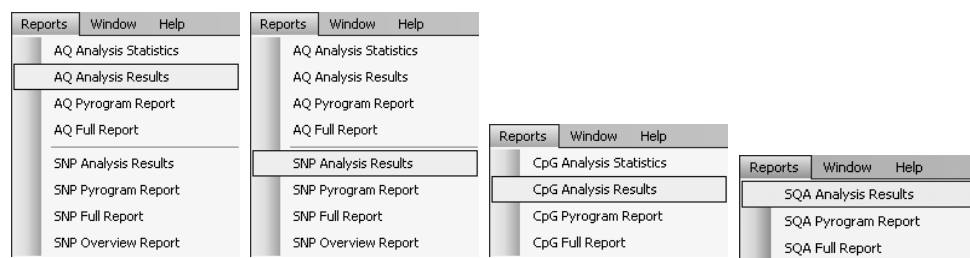
“Passed/Check”
(Superata/Controllare)

I risultati di analisi da includere. I calcoli possono essere eseguiti sui risultati con valutazione di qualità “Passed” e/o “Check”.

Nota: se occorre includere nel report tutti i risultati “passed” e “check”, è possibile escludere i risultati all’interno di questo gruppo disattivando l’opzione “Analyze” per queste posizioni nella scheda “Analysis Setup” (vedere Configurazione delle posizioni variabili, a pagina 25).

Per visualizzare il report prima di salvarlo o stamparlo, fare clic su “Preview” (Anteprima).

Report “Analysis results”



Il report “Analysis Results” include le seguenti informazioni per tutti i pozzetti o per quelli selezionati (vedere Selezione dei pozzetti, a pagina 18):

- Informazioni sui pozzetti (nome dei pozzetti, nome del dosaggio e ID campione)
- Frequenze alleliche (report AQ), genotipi (report SNP), percentuali di metilazione (report CpG) o sequenze di basi (report SQA), oltre alle valutazioni di qualità
- La percentuale di metilazione media e la deviazione standard di tutti i siti CpG con valutazione di qualità superata in un pozzetto (solo report CpG)

- La percentuale di metilazione più alta e più bassa in un pozzetto (solo report CpG)
- Informazioni sul fatto che parametri di analisi, valutazioni di qualità e risultati di analisi (solo report SQA) siano stati modificati o meno dall'utente.

Opzionale: versione di analisi, note sui pozzetti e avvertenze sull'analisi. Nei report AQ e CpG, è inoltre possibile includere i nomi e le valutazioni di qualità originali e/o correnti per le posizioni variabili.

Il report può essere salvato come file di testo (*.tsv o *.csv) o file HTML (.html). Il report può essere importato in Microsoft Excel o altre applicazioni in grado di gestire file di testo (*.tsv o *.csv) con dati separati da punto e virgola (;) o tabulazioni. Questo è utile quando si fanno ulteriori calcoli sui dati. La prima riga del report indica il nome del processo. Le due o tre righe successive contengono le intestazioni delle colonne. Ciascuna delle righe successive alle intestazioni delle colonne contiene informazioni dettagliate sui pozzetti e statistiche relative a un determinato pozzetto.

Opzioni del report

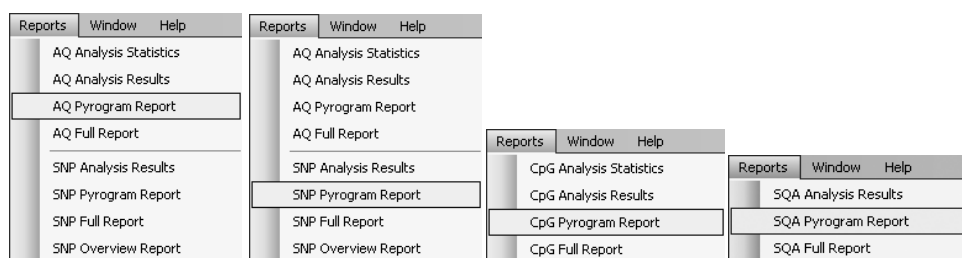
La finestra di dialogo "Analysis Results Report" (Report risultati di analisi) contiene le seguenti opzioni:

| | |
|--|---|
| "All wells/Selected wells" (Tutti i pozzetti/Pozzetti selezionati) | I pozzetti da includere nel report. |
| "Sort by row/column" (Ordina per riga/colonna) | L'ordinamento dei pozzetti. |
| Finestra qualità "All/Passed/Passed + Check/Only" (Tutti/Superata/Superata + Controllare/Solo) | Le basi nella sequenza di basi da includere nel report. Questa opzione è disponibile solo per il report SQA. |
| "Note column" (Colonna note) | Se questa opzione è selezionata, è inclusa una colonna con le note sui pozzetti. |
| "Warnings column" (Colonna avvertenze) | Se questa opzione è selezionata, è inclusa una colonna con le avvertenze sull'analisi. |

| | |
|---|--|
| <p>“Analysis version column” (Colonna versione analisi)</p> | <p>Se questa opzione è selezionata, è inclusa una colonna con la versione dell’analisi.</p> |
| <p>“Position name column” (Colonna nome posizione)</p> | <p>Se questa opzione è selezionata, è inclusa una colonna con i nomi delle posizioni variabili. Questa opzione non è disponibile per il report SQA.</p> |
| <p>“Quality column” (Colonna qualità)</p> | <p>Se questa opzione è selezionata, è inclusa una colonna con le valutazioni di qualità correnti.</p> |
| <p>“Original quality columns” (Colonna qualità originale)</p> | <p>Se questa opzione è selezionata, è inclusa una colonna con le valutazioni di qualità originali. Questa opzione non è disponibile per il report SQA.</p> |

Per visualizzare il report prima di salvarlo o stamparlo, fare clic su “Preview”.

Report “Pyrogram”



Il report Pyrogram include le informazioni sui pozzetti (nome del pozzetto, nome del dosaggio, ID campione e note pozzetti) e il pirogramma per tutti i pozzetti o per quelli selezionati (vedere Selezione dei pozzetti, a pagina 18). Se parametri di analisi, valutazioni di qualità o risultati di analisi (solo dosaggi SQA) sono stati modificati dall’utente, questo dato è segnalato nel report.

Le seguenti informazioni, icone e colori sono visualizzati e usati nei report AQ, SNP e CpG:

- Nome dei pozzetti e sequenza da analizzare
- Risultato di analisi — frequenze alleliche (report AQ), genotipi (report SNP) o percentuali di metilazione (report CpG) — è visualizzato sopra ogni posizione variabile, per esempio --: 56% (Inserzione/Delezione) e 96%. Il colore di fondo indica la valutazione di qualità del risultato di analisi; vedere legenda colori a pagina 48

Nota: -- (in bianco) = Deselezionato dall’utente. N/A (in bianco) = Il software non supporta l’analisi, per esempio analisi di SNP in modalità CpG. N/A (in rosso) = Impossibile analizzare a causa di dati insufficienti

- A discrezione dell'utente, le posizioni variabili sono evidenziate da un colore grigio azzurro di fondo
- I controlli trattati con bisolfite sono evidenziati da un colore giallo chiaro di fondo (solo report CpG).

Nel report SQA, sono visualizzate le seguenti informazioni e i seguenti colori:

- Nome del pozzetto.
- La sequenza di basi. Il colore di fondo di una base all'interno di una sequenza indica la valutazione di qualità corrispondente; vedere legenda colori a pagina 48
- Se è incluso un Pyrogram compensato, i picchi sono colorati in base alle loro valutazioni di qualità.

Opzioni del report

La finestra di dialogo "Pyrogram Report" (Report Pyrogram) contiene le seguenti opzioni:

| | |
|--|---|
| "All wells/Selected wells" (Tutti i pozzetti/Pozzetti selezionati) | I pozzetti da includere nel report. |
| "Number of rows/columns" (Numero di righe/colonne) | Numero di colonne e di righe di un pirogramma su ogni foglio. |
| "Sort by row/column" (Ordina per riga/colonna) | L'ordinamento dei pozzetti. |
| "Portrait/Landscape" (Verticale/Orizzontale) | L'orientamento della carta. |
| "Highlight variable regions" (Evidenzia regioni variabili) | Se questa opzione è selezionata, le regioni variabili sono evidenziate da un colore grigio azzurro di fondo. Questa opzione non è disponibile per il report SQA. |
| "Show peak levels" (Mostra livelli dei picchi) | Se questa opzione è selezionata, Pyrogram visualizza i livelli dei picchi calcolati. Questa opzione è disponibile solo per il report SQA. |

“Raw Pyrogram/
Compensated
Pyrogram” (Pyrogram
grezzo/compensato)

Tipo di pirogramma da includere nel report.
Questa opzione è disponibile solo per il report SQA.

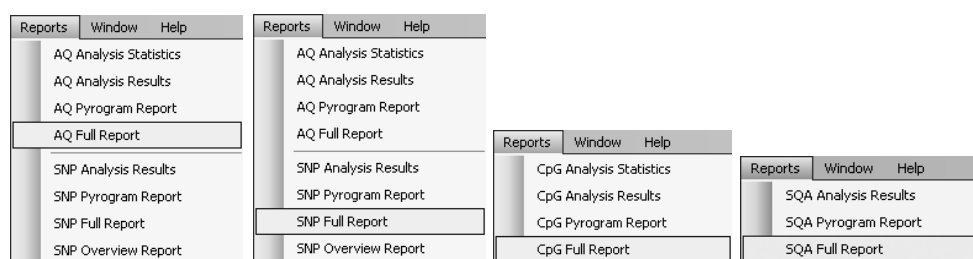
“Paper size”
(Dimensioni carta)

Dimensioni della carta (A4, A3, lettera o tabloid).

Per visualizzare il report prima di salvarlo o stamparlo, fare clic su “Preview”.

Nota: per visualizzare il report, sul computer deve essere installato un programma di lettura PDF. Adobe Reader può essere scaricato all'indirizzo www.adobe.com.

Report “Full”



Il report “Full” (Completo) include le seguenti informazioni per tutti i pozzetti o per quelli selezionati (vedere Selezione dei pozzetti, a pagina 18):

- Parametri di processo (nome, data e ora del processo, metodo dello strumento, nome dello strumento, numero di serie, operatore, ID piastra, codice a barra, ID reagenti e nota sul processo) e un registro del processo
- Informazioni sul pozzetto (nome del pozzetto, nome del dosaggio, ID campione e nota sul pozzetto), versione dell'analisi, dosaggio AQ o CpG, sequenza da analizzare
- Pyrogram. Per informazioni su icone e colori usati nell'area Pyrogram, vedere report “Pyrogram”, pagina 58
- Le frequenze alleliche (report AQ), genotipi (report SNP), percentuali di metilazione (report CpG) o sequenze di basi (report SQA), oltre alle valutazioni di qualità
- Avvertenze sull'analisi
- Se i parametri di analisi o le valutazioni di qualità sono stati modificati dall'utente, saranno elencati i pozzetti interessati.

Opzioni del report

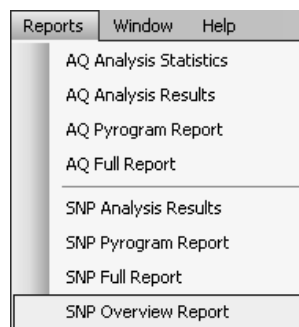
La finestra di dialogo "Full Report" contiene le seguenti opzioni:

| | |
|--|---|
| "All wells/Selected wells" (Tutti i pozzetti/Pozzetti selezionati) | I pozzetti da includere nel report. |
| "Raw Pyrogram/Compensated Pyrogram" (Pyrogram grezzo/compensato) | Tipo di pirogramma da includere nel report. Questa opzione è disponibile solo per il report SQA. |

Per visualizzare il report prima di salvarlo o stamparlo, fare clic su "Preview".

Nota: per visualizzare il report, sul computer deve essere installato un programma di lettura PDF. Adobe Reader può essere scaricato all'indirizzo www.adobe.com.

Report "SNP overview"



"SNP Overview Report" include i genotipi e le valutazioni di qualità di tutti gli SNP e InDel (Inserzioni/Delezioni). Le informazioni sono presentate nelle panoramiche della piastra con un numero per ogni posizione della piastra. Il colore di fondo indica la valutazione di qualità dell'SNP; vedere legenda colori a pagina 48.

Se i parametri di analisi o le valutazioni di qualità sono stati modificati dall'utente, i pozzetti pertinenti saranno elencati all'inizio del report.

Per visualizzare il report prima di salvarlo o stamparlo, fare clic su "Preview" nella finestra di dialogo "SNP Overview Report".

| Position 1 | | | | | | | | |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| A | T/T | T/T | C/G | C/G | -- | C/C | A/G | A/G |
| B | -T | -T | C/T | C/T | G/G | G/G | G/G | G/G |
| C | -T | -T | G/T | G/T | C/G | C/G | G/G | G/G |

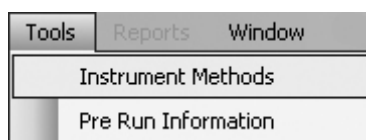
| Position 2 | | | | | | | | |
|------------|-----|-----|---|---|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| A | -/- | -/- | | | -- | A/A | G/G | G/G |
| B | -C | -C | | | A/A | A/A | G/G | G/G |
| C | -C | -C | | | A/A | A/A | G/G | G/G |

Estrazione da un report. L'opzione "Analyze" è stata disattivata per la posizione 1 e 2 nel pozzetto A5. I pozzetti A3-A4, B3-B4 e C3-C4 non hanno alcun SNP o InDel (Inserzione/Delezione) in posizione 2.

Nota: le posizioni variabili possono essere escluse dal report disattivando l'opzione "Analyze" nella scheda "Analysis Setup" (vedere Configurazione delle posizioni variabili, a pagina 25).

Nota: il report SNP Overview (Panoramica SNP) è disponibile solo in modalità AQ. per visualizzare il report, sul computer deve essere installato un programma di lettura PDF. Adobe Reader può essere scaricato all'indirizzo www.adobe.com.

Gestione dei metodi dello strumento



Il metodo dello strumento deve essere selezionato in base ai reagenti e alla cartuccia reagenti che sarà utilizzata per il processo. Il numero di metodo stampato sulla Cartuccia PyroMark Q24 corrisponde alle impostazioni specifiche del metodo fornite all'indirizzo www.qiagen.com/Products/PyroMarkQ24MDx.aspx.

Nota: si raccomanda di utilizzare solo metodi forniti da QIAGEN.

Per importare un nuovo metodo:

1. Dal suddetto sito Web, scaricare il file di metodo corrispondente al numero di metodo stampato sull'etichetta della cartuccia. Salvarlo sul computer sul quale è installato il Software PyroMark Q24 MDx.
2. Nella finestra di dialogo "Instrument Methods", fare clic su "Import". Si apre la finestra "Find Instrument Method" (Trova metodo strumento).
3. Individuare e selezionare il metodo da importare e fare clic su "Open".

Per creare un nuovo metodo:

1. **Nella finestra di dialogo "Metodo strumento", selezionare un metodo esistente e fare clic su "Save As".**
2. **Immettere un nome per il nuovo metodo e premere "Enter".**
3. **Cambiare le impostazioni del metodo nella finestra di dialogo per farle corrispondere a quelle pubblicate su www.qiagen.com/Products/PyroMarkQ24MDx.aspx.**
4. **Fare clic su "Save".**

Parametri dei metodi

Nella finestra di dialogo "Metodi strumento", sono disponibili i seguenti parametri.

| | |
|---|--|
| "Reagent pressure" (Pressione del reagente) | Pressione (millibar) per la dispensazione della miscela enzimatica e della miscela di substrato. |
| "Enzyme pulse time" (Tempo impulso enzimi) | Tempo di dispensazione (millisecondi) per la miscela enzimatica. |
| "Substrate pulse time" (Tempo impulso substrato) | Tempo di dispensazione (millisecondi) per la miscela di substrato. |
| "Nucleotide pressure" (Pressione nucleotidi) | Pressione (millibar) dalla dispensazione dei nucleotidi. |
| "Nucleotide pulse time" (Tempo impulso nucleotidi) | Tempo di dispensazione (millisecondi) per i nucleotidi. |
| "Note" (Nota) | Nota sul metodo dello strumento (opzionale). |

Suggerimenti e consigli generali

Convalida dei dosaggi

Convalidare i campioni usando i campioni di DNA di riferimento, vedere Appendice B del *Manuale utente PyroMark Q24 MDx*.

Registro analisi

Tutte le analisi eseguite vengono memorizzate in un registro in cui sono specificati impostazioni, modalità di analisi (AQ, CpG, o SQA), versione di analisi, risultati (incluse le avvertenze), data e ora e l'utente che ha eseguito l'analisi. Affinché le informazioni sull'utente che ha eseguito l'analisi e che ha creato un dosaggio o elaborato un file siano corrette, tutti gli utenti devono accedere a Windows utilizzando i propri account utente. Per ulteriori informazioni su account utente e modalità di connessione/disconnessione, consultare la guida in linea di Windows o contattare l'amministratore di sistema.

Per visualizzare il registro di analisi per un pozzetto selezionato, selezionare "Analysis Log" dal menu "Tools".

Protezione dei file

Per proteggere un file dall'eventuale modifica da parte di un altro utente, salvare il file in una cartella a cui si ha accesso esclusivo. Per ulteriori informazioni, contattare l'amministratore di sistema.

Per proteggere un file dalla sovrascrittura accidentale da parte di un utente, impostare per il file l'attributo "Read-only" (Sola lettura) usando Windows Explorer:

- 1. Chiudere il file nel Software PyroMark Q24 MDx.**
- 2. Aprire Windows Explorer e localizzare il file.**

A tal fine, fare clic con il pulsante destro del mouse sulla cartella contenente il file nel browser dei collegamenti e selezionare "Explore" (Esplora) dal menu contestuale.

- 3. In Windows Explorer, fare clic con il pulsante destro del mouse sul file e selezionare "Properties" dal menu contestuale.**
- 4. Quando la finestra di dialogo "Properties" si apre, selezionare l'attributo "Read-only" (Sola lettura) e fare clic su "OK".**

Si consiglia di effettuare di frequente una copia di backup.

Protezione dei risultati di analisi

Non è possibile modificare i parametri o i risultati di analisi per un dosaggio bloccato (🔒). Per bloccare un dosaggio, aprire il file del dosaggio e fare clic sul pulsante "Lock Assay" nella parte inferiore della finestra di configurazione dosaggio. Bloccare il dosaggio prima di aggiungerlo alla piastra.

Guida alla risoluzione dei problemi

| Errori | Commenti e suggerimenti |
|--|--|
| a) Crocetta rossa sui pozzetti nella scheda "Overview" durante l'analisi | Contattare l'assistenza tecnica QIAGEN. |
| b) Compare la finestra di dialogo "Exception" (Eccezione) | Salvare il report dell'errore e inviarlo all'assistenza tecnica QIAGEN a scopo informativo. Fare clic su "Continue" (Continua) per procedere con l'analisi. Se la finestra di dialogo rimane visualizzata, fare clic su "Quit" (Esci) e riavviare il software. |
| c) Impossibile creare un dosaggio dal file del Software PyroMark Assay Design. | Verificare di aver importato un tipo di file dosaggio valido (AQ, CpG, o SNP). |

Per problemi collegati all'analisi, consultare la sezione Risoluzione dei problemi del *Manuale utente PyroMark Q24 MDx*.

Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) del nostro servizio di assistenza tecnica:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti del servizio di assistenza tecnica di QIAGEN sono sempre lieti di rispondere a qualsiasi domanda possiate avere, per quanto riguarda le informazioni ed i protocolli presenti in questo manuale, oppure le tecnologie per campioni e analisi (per le informazioni sui contatti, vedere sul retro oppure visitare il sito www.qiagen.com).

Appendice A: Messaggi del Software PyroMark Q24 MDx

Di seguito è riportato un elenco di messaggi d'uso, di avvertenza e di errore che possono essere visualizzati nel Software PyroMark Q24 MDx durante la configurazione del dosaggio, la sua elaborazione e l'analisi dei dati.

| Testo del messaggio | Spiegazione |
|---------------------|-------------|
|---------------------|-------------|

Messaggi generici sulla configurazione

| | |
|---|--|
| "The dispensation order is very long" (Ordine di dispensazione molto lungo) | L'ordine di dispensazione è lungo più di 200 basi. |
|---|--|

Messaggi generici sull'analisi

| | |
|--|--|
| "Not analyzable due to lack of data (overall)" (Non analizzabile causa dati insufficienti (complessivi)) | Picchi insufficienti in Pyrogram per analizzare i dati. Questa avvertenza esclude tutte le altre avvertenze. |
|--|--|

| | |
|---|---|
| "High pre-sequencing signal" (Segnale di presequenziamento elevato) | Il picco del substrato è elevato rispetto al livello di rumore e del picco singolo. |
|---|---|

| | |
|--|---|
| "Uncertain due to baseline drift" (Incerta per spostamento della linea di base). | Spostamento anomalo della linea di base, che può avere un impatto negativo sul risultato. |
|--|---|

| | |
|---|---|
| "Failed due to possible dispensation error at dispensation" (Valutazione di qualità non superata causa possibile errore di dispensazione in corrispondenza della dispensazione) | Possibile errore alla(e) dispensazione(i) indicata(e). Questo compromette la qualità di tutti i siti successivi all'errore. |
|---|---|

| | |
|--|--|
| "No peaks detected between dispensations" (Nessun picco rilevato tra le dispensazioni) | Nessun picco rilevato benché tutti i nucleotidi siano stati dispensati; questo può indicare un problema a carico dell'unità di dispensazione. Questo si ripercuote sul colore di tutti i siti successivi all'errore. |
|--|--|

| Testo del messaggio | Spiegazione |
|---|---|
| “Uncertain due to wide peaks” (Incerta per picchi ampi) | La durata media dei picchi supera il limite per rientrare nella valutazione di qualità “check” (controllare). Si ripercuote sulla qualità di tutti i siti nella sequenza. |

Messaggi di configurazione dosaggio in modalità AQ

| | |
|---|---|
| “Invalid sequence” (Sequenza non valida) | Errore nella sequenza da analizzare immessa. |
| “Variable positions with common dispensations cannot be analyzed” (Impossibile analizzare le posizioni variabili con dispensazioni comuni) | Le dispensazioni di nucleotidi per più polimorfismi sono fuori fase. |
| “The generated dispensation order contains less reference peaks than required” (L’ordine di dispensazione generato contiene meno picchi di riferimento del necessario). | Il dosaggio contiene meno di cinque picchi costanti con un valore previsto superiore di 1. |
| “Sequence uncertain due to lack of terminal sequence information” (Sequenza incerta per informazioni sequenza terminale insufficienti). | L’ultimo nucleotide nella sequenza da analizzare è stato dispensato, ciò significa che l’altezza del picco prevista dell’ultima dispensazione è sconosciuta. Nota: la sequenza da analizzare deve essere di un nucleotide più lunga rispetto all’ordine di dispensazione. |
| “Last variable position not analyzable due to lack of terminal sequence information” (Impossibile analizzare ultima posizione variabile per informazioni sequenza terminale insufficienti) | Nessuna informazione sulla sequenza immessa dopo l’ultima regione variabile; ciò significa che l’altezza prevista del picco della posizione variabile è sconosciuta. Nota: la sequenza da analizzare deve essere di un nucleotide più lunga rispetto all’ordine di dispensazione. |

| Testo del messaggio | Spiegazione |
|---|--|
| “Sequence not in phase at the end of the dispensations” (Sequenza non in fase al termine delle dispensazioni). | La sequenza non è in fase dopo la dispensazione di tutti i nucleotidi; ciò significa che l’altezza prevista del picco della posizione variabile è sconosciuta. |
| “Quantification may be uncertain: the variable position consists of more than 5 dispensations” (La quantificazione può essere incerta: la posizione variabile è costituita da oltre 5 dispensazioni) | Le dispensazioni dei nucleotidi si verificano fuori fase in corrispondenza di un polimorfismo in oltre 5 dispensazioni e questo può avere un impatto negativo sul risultato. |
| “Quantification may be uncertain: the variable position consists of more than 5 dispensations” (La quantificazione può essere incerta: la posizione variabile è costituita da oltre 5 dispensazioni). | Una posizione di InDel (Inserzione/Delezione) richiede l’analisi di oltre 5 dispensazioni e questo può avere un impatto negativo sul risultato. |
| “Quantification may be uncertain: the variable position contains a homopolymer” (La quantificazione può essere incerta: la posizione variabile contiene un omopolimero). | Un omopolimero di altezza ≥ 3 precede o segue una Inserzione/Delezione a base singola. L’avvertenza indica che il sito è molto difficile da analizzare. |

Messaggi di analisi in modalità AQ

| | |
|---|--|
| “Analysis not supported” (Analisi non supportata) | Il sito variabile non è supportato in modalità AQ. |
| “Deselected by user” (Deselezionato dall’utente) | L’utente ha deselezionato il sito variabile dall’analisi. |
| “The sequence contains less reference peaks than required” (La sequenza contiene meno picchi di riferimento del necessario) | Il Pyrogram contiene meno di 5 picchi costanti con un valore previsto superiore a 1. |

| Testo del messaggio | Spiegazione |
|--|--|
| "Not analyzable due to lack of data" (Non analizzabile causa dati insufficienti) | Picchi insufficienti in un sito per analizzare i dati. |
| "The variable position contains a homopolymer" (La posizione variabile contiene un omopolimero). | Un omopolimero di altezza ≥ 3 precede o segue InDel (Inserzioni/Delezioni) a base singola. Questa avvertenza indica che il sito è molto difficile da analizzare. |
| "Uncertain due to low signal-to-noise ratio" (Incerta per basso rapporto segnale-rumore) | La somma dei picchi nella regione variabile non è significativamente diversa dal rumore, e questo può avere un impatto negativo sul risultato. |
| "Failed due to low signal-to-noise ratio" (Valutazione di qualità "non superata" causa basso rapporto segnale-rumore) | La somma dei picchi nella regione variabile non è significativamente diversa dal rumore, e questo può avere un impatto negativo sul risultato. |
| "Uncertain due to low peak height" (Incerta per bassa altezza di picco) | Il livello del picco singolo all'inizio del Pyrogram è inferiore all'altezza di picco richiesta per raggiungere una valutazione di qualità "superata" (definita nella configurazione del dosaggio). |
| "Failed due to low peak height" (Valutazione di qualità non superata per bassa altezza di picco) | Il valore RLU del picco nella posizione indicata è inferiore al valore per ottenere una valutazione di qualità "non superata" predefinito. |
| "Uncertain due to high sum deviation in variable position" (Incerta per elevata deviazione somma in posizione variabile) | La somma dei picchi in una regione variabile differisce dal livello previsto del picco singolo in corrispondenza della posizione polimorfica, superando il limite previsto per rientrare nella valutazione di qualità "check" (controllare). |

Testo del messaggio

Spiegazione

"Failed due to high sum deviation in variable position" (Non superata per elevata deviazione somma in posizione variabile)

La somma dei picchi in una regione variabile differisce dal livello previsto del picco singolo in corrispondenza della posizione polimorfica, superando il limite previsto per rientrare nella valutazione di qualità "fail" (non superata).

"Uncertain due to high pattern deviation in variable position" (Incerta per elevata deviazione pattern in posizione variabile)

L'abbinamento migliore dai possibili pattern di frequenza devia dal pattern effettivo, superando il limite previsto per rientrare in una valutazione di qualità "check" (controllare).

"Failed due to high pattern deviation in variable position" (Non superata per elevata deviazione pattern in posizione variabile)

L'abbinamento migliore dai possibili pattern di frequenza devia dal pattern effettivo, superando il limite previsto per rientrare in una valutazione di qualità "fail" (non superata).

"Uncertain surrounding reference sequence pattern" (Pattern della sequenza di riferimento circostante incerto)

Le altezze dei picchi misurate nella finestra di qualità deviano dai valori previsti, superando il limite per rientrare nella valutazione di qualità "check" (controllare).

"Failed surrounding reference sequence pattern" (Pattern della sequenza di riferimento circostante non riuscito)

Le altezze dei picchi misurate nella finestra di qualità deviano dai valori previsti, superando il limite per rientrare nella valutazione di qualità "fail" (non superata).

"Uncertain due to high peak height deviation at dispensation" (Incerta per deviazione elevata altezza di picco alla dispensazione)

L'altezza del picco misurata alla dispensazione specificata devia dal valore previsto, superando il limite per rientrare nella valutazione di qualità "check" (controllare).

| Testo del messaggio | Spiegazione |
|--|--|
| “Failed due to high peak height deviation at dispensation” (Non superata per deviazione elevata altezza di picco alla dispensazione) | L'altezza del picco misurata alla dispensazione specificata devia dal valore previsto, superando il limite per rientrare nella valutazione di qualità “fail” (non superata). |
| “Uncertain reference sequence pattern at more than 5 dispensations” (Pattern della sequenza di riferimento circostante incerto in oltre 5 dispensazioni) | Le altezze dei picchi misurate nella finestra di qualità deviano dai valori previsti in oltre 5 dispensazioni, superando il limite per rientrare nella valutazione di qualità “check” (controllare). |
| “Failed reference sequence pattern at more than 5 dispensations” (Pattern della sequenza di riferimento non riuscito in oltre 5 dispensazioni) | Le altezze dei picchi misurate nella finestra di qualità deviano dai valori previsti in oltre 5 dispensazioni, superando il limite per rientrare nella valutazione di qualità “fail” (non superata). |

Messaggi di analisi in modalità SNP

| | |
|--|--|
| “Failed genotype determination” (Determinazione genotipi non riuscita) | La differenza tra il primo e il secondo abbinamento migliore di genotipi è più esigua del limite per rientrare nella valutazione di qualità “fail” (non superata). |
| “Uncertain genotype determination” (Determinazione genotipi incerta) | La differenza tra il primo e il secondo abbinamento migliore di genotipi è più esigua del limite per rientrare nella valutazione di qualità “check” (controllare). |

Messaggi di configurazione dosaggio in modalità CpG

| | |
|---|--|
| “Invalid sequence” (Sequenza non valida) | Errore nella sequenza da analizzare immessa. |
| “Cannot resolve sequence direction” (Impossibile risolvere la direzione della sequenza) | La sequenza da analizzare immessa include nucleotidi che sono specifici per sequenze trattate con bisolfito “forward” o “reverse”. |
| “A CpG site has to be biallelic” (Un sito CpG deve essere biallelico) | Si verifica se il sito CpG indicato include un polimorfismo supplementare; per esempio, C/T/AG. |

Testo del messaggio

Spiegazione

“Variable positions with common dispensations cannot be analyzed” (Impossibile analizzare le posizioni variabili con dispensazioni comuni)

Nucleotide dispensations for several polymorphisms are out-of-phase (Le dispensazioni di nucleotidi per più polimorfismi sono fuori fase).

Impossibile analizzare una regione variabile valutata per la dispensazione dei nucleotidi che si applica a uno o più polimorfismi (dispensazione comune). Per esempio, la sequenza da analizzare A/GC/TCAC con l'ordine di dispensazione CATCGTCA non sarà analizzata, poiché le dispensazioni saranno fuori fase.

“The generated dispensation order contains less reference peaks than required” (L'ordine di dispensazione generato contiene meno picchi di riferimento del necessario).

Il dosaggio contiene meno di 5 picchi costanti con un valore previsto maggiore di 1.

“Sequence uncertain due to lack of terminal sequence information” (Sequenza incerta per informazioni sequenza terminale insufficienti).

L'ultimo nucleotide nella sequenza da analizzare è stato dispensato, ciò significa che l'altezza del picco prevista dell'ultima dispensazione è sconosciuta.

“Last variable position not analyzable due to lack of terminal sequence information” (Impossibile analizzare ultima posizione variabile per informazioni sequenza terminale insufficienti)

Nessuna informazione sulla sequenza immessa dopo l'ultima regione variabile; ciò significa che l'altezza prevista del picco della posizione variabile è sconosciuta.

“Sequence not in phase at the end of the dispensations” (Sequenza non in fase al termine delle dispensazioni)

La sequenza non è in fase dopo la dispensazione di tutti i nucleotidi; ciò significa che l'altezza prevista del picco della posizione variabile è sconosciuta.

| Testo del messaggio | Spiegazione |
|--|--|
| “Quantification may be uncertain: the variable position consists of more than 5 dispensations” (La quantificazione può essere incerta: la posizione variabile è costituita da oltre 5 dispensazioni) | Le dispensazioni dei nucleotidi si verificano fuori fase in corrispondenza di un polimorfismo in oltre 5 dispensazioni e questo può avere un impatto negativo sul risultato. |

Messaggi di analisi in modalità CpG

| | |
|---|---|
| “Analysis not supported” (Analisi non supportata) | Il sito variabile non è supportato in modalità CpG. |
| “Deselected by user” (Deselezionato dall’utente) | L’utente ha deselezionato il sito variabile dall’analisi. |
| “Uncertain bisulfite conversion at dispensation” (Conversione con bisolfito incerta alla dispensazione) | Il picco del controllo con bisolfito nella dispensazione(i) indicata(i) è superiore al limite per rientrare nella valutazione di qualità “check” (controllare). Si ripercuote sulla qualità di tutti i siti della sequenza. |
| “Failed bisulfite conversion at dispensation” (Conversione con bisolfito non riuscita alla dispensazione) | Il picco per il controllo con bisolfito alla dispensazione indicata è superiore al limite per rientrare nella valutazione di qualità “fail” (non superata). Si ripercuote sulla qualità di tutti i siti successivi della sequenza. |
| “The sequence contains less reference peaks than required” (La sequenza contiene meno picchi di riferimento del necessario) | Il Pyrogram contiene meno di 5 picchi costanti con un valore previsto superiore a 1. |
| “Not analyzable due to lack of data” (Non analizzabile causa dati insufficienti) | Picchi insufficienti in un sito per analizzare i dati. |
| “Uncertain due to low signal-to-noise ratio” (Incerta per basso rapporto segnale-rumore) | La somma dei picchi nella regione variabile non è significativamente diversa dal rumore (al di sotto del limite per rientrare nella valutazione di qualità “check”, controllare), e questo può avere un impatto negativo sul risultato. |

Testo del messaggio

Spiegazione

| | |
|---|--|
| <p>“Failed due to low signal-to-noise ratio” (Valutazione di qualità “non superata” causa basso rapporto segnale-rumore)</p> | <p>La somma dei picchi nella regione variabile non è significativamente diversa dal rumore (al di sotto del limite per rientrare nella valutazione di qualità “fail”, non superata) e questo può avere un impatto negativo sul risultato.</p> |
| <p>“Uncertain due to low peak height” (Incerta per bassa altezza di picco)</p> | <p>Il livello del picco singolo all’inizio del Pyrogram è inferiore all’altezza di picco richiesta per raggiungere una valutazione di qualità “superata” (definita nella configurazione del dosaggio).</p> |
| <p>“Failed due to low peak height” (Valutazione di qualità non superata per bassa altezza di picco)</p> | <p>Il valore RLU del picco nella posizione indicata è inferiore al valore per ottenere una valutazione di qualità “non superata” predefinito.</p> |
| <p>“Uncertain due to high sum deviation in variable position” (Incerta per elevata deviazione somma in posizione variabile)</p> | <p>La somma dei picchi in una regione variabile differisce dal livello previsto del picco singolo in corrispondenza della posizione polimorfica, e la differenza supera il limite previsto per rientrare nella valutazione di qualità “check” (controllare).</p> |
| <p>“Failed due to high sum deviation in variable position” (Non superata per elevata deviazione somma in posizione variabile)</p> | <p>La somma dei picchi in una regione variabile differisce dal livello previsto del picco singolo in corrispondenza della posizione polimorfica, e la differenza supera il limite per rientrare nella valutazione di qualità “non superata”.</p> |
| <p>“Uncertain due to high pattern deviation in variable position” (Incerta per elevata deviazione pattern in posizione variabile)</p> | <p>L’abbinamento migliore dai possibili pattern di frequenza devia dal pattern effettivo, superando il limite previsto per rientrare in una valutazione di qualità “check” (controllare).</p> |
| <p>“Failed due to high pattern deviation in variable position” (Non superata per elevata deviazione pattern in posizione variabile)</p> | <p>L’abbinamento migliore dai possibili pattern di frequenza devia dal pattern effettivo, superando il limite previsto per rientrare in una valutazione di qualità “fail” (non superata).</p> |

| Testo del messaggio | Spiegazione |
|--|--|
| "Uncertain surrounding reference sequence pattern" (Pattern della sequenza di riferimento circostante incerto) | Le altezze dei picchi misurate nella finestra di qualità deviano dai valori previsti, superando il limite per rientrare nella valutazione di qualità "check" (controllare). |
| "Failed surrounding reference sequence pattern" (Pattern della sequenza di riferimento circostante non riuscito) | Le altezze dei picchi misurate nella finestra di qualità deviano dai valori previsti, superando il limite per rientrare nella valutazione di qualità "fail" (non superata). |
| "Uncertain due to high peak height deviation at dispensation" (Incerta per deviazione elevata altezza di picco alla dispensazione) | L'altezza del picco misurata alla dispensazione specificata devia dal valore previsto, superando il limite per rientrare nella valutazione di qualità "check" (controllare). |
| "Failed due to high peak height deviation at dispensation" (Non superata per deviazione elevata altezza di picco alla dispensazione) | L'altezza del picco misurata alla dispensazione specificata devia dal valore previsto, superando il limite per rientrare nella valutazione di qualità "fail" (non superata). |
| "Uncertain reference sequence pattern at more than 5 dispensations" (Pattern della sequenza di riferimento circostante incerto in oltre 5 dispensazioni) | Le altezze dei picchi misurate nella finestra di qualità deviano dai valori previsti in oltre 5 dispensazioni, superando il limite per rientrare nella valutazione di qualità "check" (controllare). |
| "Failed reference sequence pattern at more than 5 dispensations" (Pattern della sequenza di riferimento non riuscito in oltre 5 dispensazioni) | Le altezze dei picchi misurate nella finestra di qualità deviano dai valori previsti in oltre 5 dispensazioni, superando il limite per rientrare nella valutazione di qualità "fail" (non superata). |

Testo del messaggio

Spiegazione

Messaggi di analisi in modalità SQA

| | |
|--|---|
| “Base-calling not consistent with entered known bases” (Appaiamento di basi non coerente con le basi note immesse) | I picchi di normalizzazione definiti dall’utente sono stati immessi e l’appaiamento di basi risultante non coincide con le informazioni immesse. |
| “Low peak height” (Bassa altezza di picco) | Il livello del picco singolo all’inizio del Pyrogram è inferiore all’altezza di picco richiesta per raggiungere una valutazione di qualità “superata” (definita nella configurazione del dosaggio). |
| “High homopolymer at dispensation” (Omopolimero elevato alla dispensazione) | Omopolimero costituito da oltre 5 nucleotidi in corrispondenza della dispensazione(e) specificata(e). |
| “Large peak height variation” (Ampia variazione di altezza dei picchi) | Ampia variazione di altezza complessiva dei picchi. Fornisce una valutazione di qualità iniziale incerta/non superata se rilevata entro le prime 5 dispensazioni. |
| “Large peak height variation around dispensation” (Ampia variazione di altezza dei picchi in prossimità della dispensazione) | Ampia variazione di altezza dei picchi all’interno di livelli a picco singolo o doppio. Specifica le dispensazioni per cui è valida questa avvertenza e assegna una valutazione di qualità incerta/non superata alla sequenza da quella dispensazione in poi. |
| “Low signal-to-noise ratio (overall)” (Basso rapporto segnale-rumore, complessivo) | Basso rapporto segnale-rumore. Determina una valutazione di qualità iniziale incerta/non superata se rilevata entro le prime 5 dispensazioni. |
| “Low signal-to-noise ratio from dispensation” (Basso rapporto segnale-rumore dalla dispensazione) | Basso rapporto segnale-rumore. Assegna una valutazione di qualità incerta/non superata alla sequenza da quella dispensazione in poi. |

| Testo del messaggio | Spiegazione |
|---|---|
| “Missing peaks in cycle starting at dispensation” (Picchi mancanti nel ciclo a partire dalla dispensazione) | Un ciclo presenta picchi mancanti (tutti e 4 i nucleotidi sono stati dispensati ma nella sequenza non è stato rilevato alcun picco). Determina una valutazione di qualità incerta a partire dall’ultimo picco rilevato. |
| “Peak height deviates from the expected peak level at dispensation” (L’altezza di picco devia dal livello di picco previsto alla dispensazione) | L’altezza del picco misurata alla dispensazione specificata devia eccessivamente dal valore previsto. Questo si ripercuote sul colore indicante la qualità della dispensazione indicata. |
| “Risk for overlaid sequence from dispensation” (Rischio di sequenza sovrapposta dalla dispensazione) | In una determinata area viene rilevata una possibile sequenza di fondo. Si ripercuote sul colore indicante la qualità dall’inizio di quell’area. |
| “Spurious peak(s) at dispensation” (Picco spuri alla dispensazione) | Vengono rilevati i picchi non classificati al di sopra di un certo valore. Si ripercuote sul colore indicante la qualità a partire dalla dispensazione specificata. |
| “Wide peaks from dispensation” (Picchi ampi dalla dispensazione) | Sono stati rilevati picchi ampi. Determina una qualità incerta a partire dalla dispensazione in cui viene rilevato. Se presente entro le prime 5 dispensazioni determina una qualità iniziale incerta. |

Riferimenti bibliografici

QIAGEN possiede un'ampia banca dati online continuamente aggiornata con le pubblicazioni scientifiche riguardanti i prodotti QIAGEN. Opzioni di ricerca specifiche consentono di trovare gli articoli necessari sia per parole chiave sia specificando l'applicazione, l'area di ricerca, il titolo, ecc.

Per un elenco bibliografico completo, visitate il QIAGEN Reference Database www.qiagen.com/RefDB/search.asp o contattate il servizio di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Pyrogram®, PyroMark®, Pyrosequencing® (Gruppo QIAGEN); Adobe®, Reader® (Adobe Systems Incorporated); Excel®, Microsoft®, Windows® (Microsoft Corporation).

Contratto di Licenza Limitato

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del Sistema PyroMark Q24 MDx System dei seguenti termini:

1. Il Software PyroMark Q24 MDx deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nella *Guida al software per l'utente PyroMark Q24 MDx* e unicamente per gli usi con i componenti contenuti nel Software. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'integrazione dei componenti del presente software con altri componenti non inclusi nello stesso, ad eccezione di quanto descritto nel Manuale utente PyroMark Q24 MDx e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com.
2. Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questo Software e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
3. Il presente software ed i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del software concordano nel non consentire a nessuno di intervenire o consentire ad altri di realizzare o contribuire a realizzare azioni proibite. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di licenza limitato, e recupererà tutte le spese di investigazione e legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di licenza limitato o qualunque diritto di proprietà intellettuale correlato al software e/o ai suoi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, consultare il sito www.qiagen.com.

© 2010 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 03-9840-9800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800/28-10-10 ■ Fax 0800/28-10-19 ■ Technical 0800/28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 0086-21-3865-3865 ■ Fax 0086-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325, 800-988-0327

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 02-33430-420 ■ Fax 02-33430-426 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 1544 7145 ■ Fax 1544 7146 ■ Technical 1544 7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-639

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 65-67775366 ■ Fax 65-67785177 ■ Technical 65-67775366

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

